

Санкт-Петербургский Государственный университет

Вашурина Наталья Сергеевна

Изучение патогенеза артрогрипоза методами протеомики и генетики

Выпускная квалификационная работа
бакалавра по направлению подготовки
06.03.01 Биология

основная образовательная программа бакалавриата СВ.5017.2014 Биология

Работа выполнена:

В лаборатории экспериментальной и прикладной генетики
НИЦ «Курчатовский Институт» - ПИЯФ
Научном парке СПбГУ - Ресурсный центр
"Развитие молекулярных и клеточных технологий"

Зав. лаборатории:

д.б.н., заместитель директора по научной работе
НИЦ «Курчатовский Институт» - ПИЯФ,
Саранцева Светлана Владимировна

Научный

руководитель: м.н.с. кафедры биохимии
биологического факультета СПбГУ
Соболева А. В.

Санкт-Петербург
2019 г

Оглавление

Список сокращений	3
1. Введение	4
2. Обзор литературы	6
2.1 История изучения артрогрипоза.....	6
2.2 Патогенез и классификация артрогрипоза	7
2.3 Методы диагностики и лечение артрогрипоза.....	12
3. Материалы и методы	16
3.1 Список реактивов.....	16
3.3 Подбор пациентов.....	19
3.4 Получение экстрактов мышечной ткани	20
3.5 Измерение концентрации белка методом Бредфорда	21
3.6 Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na.....	21
3.6.1 Одномерный электрофорез	22
3.6.2 Двумерный электрофорез.....	22
3.6.3 2D DIGE	23
3.6.4 Окрашивание гелей Кумасси	23
3.7 Трипсинолиз белка в геле	23
3.8 Хромато-масс-спектрометрический анализ	24
3.9 Выделение ДНК из крови	24
3.10 Экзомное секвенирование.....	24
3.11 Постановка ПЦР	24
3.12 Электрофорез в агарозном геле	26
3.13 Выделение ДНК из геля	27
3.14 Измерение концентрации ДНК	27
3.15 Секвенирование	27
3.16 Анализ хроматограмм	27
4. Результаты и обсуждение результатов	28
5. Заключение.....	44
6. Выводы	45
7. Благодарности	46
8. Список литературы	47
9. Приложение.....	40

Список сокращений

2D DIGE (от англ. 2B Difference gel electrophoresis) - двумерный дифференциальный электрофорез

dNTP (от англ. deoxyribonucleotide triphosphate) - смесь 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов

АА - акриламид

БисАА - N-N'-метилен-бис-акриламид

БСА - бычий сывороточный альбумин

БФС – бром-феноловый синий

ВМА – врожденный множественный артрогрипоз

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДА – дистальный артрогрипоз

ДДС-Na - додецилсульфат натрия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ - Дитиотреитол

ЖХ – жидкостная хроматография

МС/МС – tandemная масс-спектрометрия

НФБ - Натрий-фосфатный буфер (англ. Phosphate buffered saline, PBS)

ПСА – персульфат аммония

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТЕМЕД - тетраметилэтилендиамин

1. Введение

Пороки развития, также известные как врожденные заболевания, характеризуются комплексом отклонений от нормального строения организма, проявившихся в процессе внутриутробного развития или в послеродовой период. Выделяют две большие группы врожденных дефектов. Первая группа – структурные дефекты, когда для заболевания характерны отклонения строения частей тела. К этой группе относят, например, пороки сердца, характеризующиеся отсутствием или деформацией клапанов, аномалии строения конечностей, такие как плоскостопие, и дефекты развития нервной трубки, такие как расщепление позвоночника. Вторая группа - функциональные аномалии, то есть, метаболические нарушения. Примерами дефектов этой группы могут быть заболевания нервной системы, например, синдром Прадера-Вилли, сенсорные проблемы, такие как слепота и глухота, заболевания, связанные с нарушением обмена веществ, например, фенилкетонурия и гипотериоз, а также дегенеративные заболевания, проявляющиеся со временем, например, мышечная дистрофия [Types of birth defects | NICHD]. Все эти нарушения возникают во время внутриутробного периода развития и могут быть идентифицированы пренатально, при рождении, или диагностированы только в младенчестве. Пороки развития могут становиться причиной пожизненной инвалидизации индивида или приводить к летальному исходу. По данным Центров по Контролю и Профилактике Заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention), врожденные дефекты являются ведущей причиной смерти среди детей в Соединенных Штатах в течение первого года жизни [Mathews, Macdorman, Thoma, 2013]. Данные Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) также подтверждают, что врожденные заболевания, наряду с острыми респираторными инфекциями, преждевременными родами и родовыми осложнениями, входят в список основных причин смертности детей до 5 лет. По различным оценкам, каждый год во всем мире 303 000 новорожденных умирают в течение 4 недель после рождения из-за наличия врожденных аномалий [Congenital anomalies].

Врожденные пороки развития костно-мышечной системы составляют большую часть от общего числа заболеваний. Так, по данным А.Г. Баиндурашвили и соавторов, в период с 2001 по 2015 год в Санкт-Петербурге было зарегистрировано 2938 случаев рождения детей с ортопедическими аномалиями [Баиндурашвили и др., 2018]. Одним из таких заболеваний является врожденный множественный артрогрипоз, или просто артрогрипоз. На сегодняшний день артрогрипоз является одним из самых тяжелых врожденных пороков развития опорно-двигательного аппарата. Для этого заболевания характерны множественные контрактуры суставов конечностей, и, как следствие их деформация. Как

правило, дети с таким диагнозом являются тяжелыми инвалидами [Альбамасова, Лузина, 1976]. Этиология данного заболевания остается неясной. Современные методы раннего консервативного лечения и своевременные хирургические вмешательства позволяют улучшить качество жизни пациентов, расширить функциональные возможности по самообслуживанию. Несмотря на достигнутые некоторые успехи, результаты лечения деформаций конечностей у больных с данной патологией нельзя считать удовлетворительными. Поэтому остро стоит задача поиска возможных биомаркеров этой формы заболевания для пренатальной диагностики и изучения патогенеза заболевания для подбора лечения [Агранович, Баиндурашвили, Петрова, 2012].

Целью данного исследования было изучения молекулярных механизмов развития артрогрипоза, в связи с чем были поставлены следующие задачи:

1. Получить экстракты мышечной ткани
2. Охарактеризовать полученные белковые фракции мышц с помощью одномерного и двумерного электрофореза, а также дифференциального двумерного электрофореза
3. Провести масс-спектрометрический анализ мышечных белков больных артрогрипозом
4. Провести экзомное секвенирование и биоинформатический анализ результатов
5. Подтвердить найденные мутации секвенированием ПЦР-фрагментов

2. Обзор литературы

2.1 История изучения артрогрипоза

Впервые в медицинской литературе случаи с подобным комплексом симптомов описаны в монографии детского ортопеда У. Адама «Косолапость: патогенез и лечение» в 1873 г. [Adams, 1873]. Термин «артрогрипоз», в переводе с греческого означающий «когтеобразные суставы», был предложен значительно позже, в 1923 году, американским ортопедом М. Штерном [Stern, 1923]. Несмотря на введение специального термина для описания данного комплекса симптомов, на протяжении долгого времени в литературе использовались различные названия заболевания, поскольку многие случаи были описаны английскими и европейскими авторами. Большое количество наименований создавало затруднения для метаанализа описанных случаев и, следовательно, формированию общепринятых взглядов на заболевание. Ч. Свиньярд выяснил, какие термины использовались для описания патологического состояния, сформировав представление о степени путаницы и разногласий, которые существовали в отношении этиологического, патологического и клинического характера артрогрипоза. [Swinyard, Mayer, 1963].

Подробная клиническая картина заболевания была подробно описана в 1932 г. английским педиатром У. Шелдоном [Sheldon, 1932]. Автор статьи считал, что причиной заболевания является врожденная мышечная аплазия. С. Мидлтон в 1934 г. опубликовал работу, где предположил, что основу патологии составляет врожденная мышечная дистрофия. В публикации также описано явление замещения мышечной ткани на жировую и соединительную [Middleton, 1934]. Е. Росси и А. Кафлиш считали, что артрогрипоз является следствием врожденного деформирующего миопатоза [ROSSI, CAFLISCH, 1951]. Таким образом, большинство авторов представление о патогенезе артрогрипоза основывали на клинической картине заболевания.

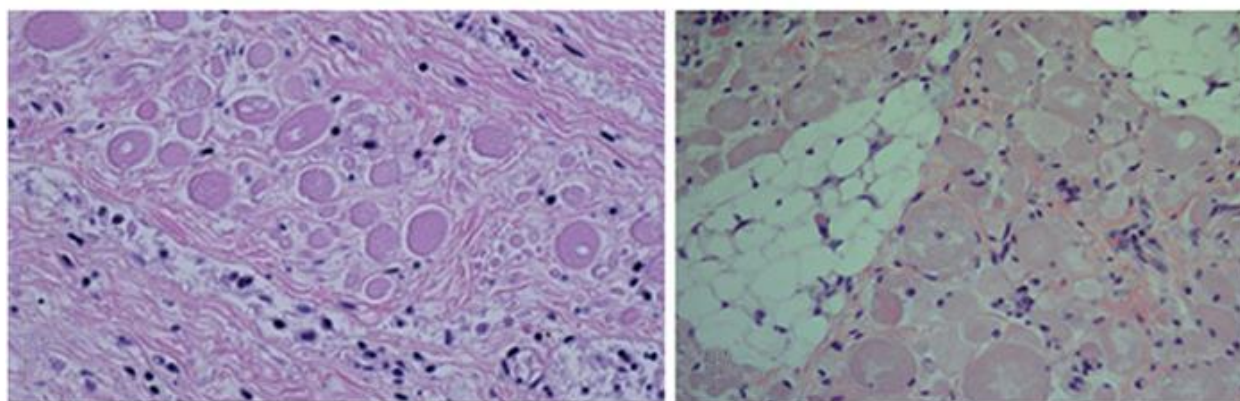
В разные временные периоды появлялись различные теории происхождения врожденного множественного артрогрипоза. На стыке девятнадцатого и двадцатого веков авторы придерживались механической теории, которая предполагает, что заболевание возникает в связи с неправильным развитием эмбриона вследствие высокого амниотического давления при нарушенном количестве околоплодных вод у беременных [Schantz, 1898; Magnus, 1903]. В середине двадцатого века появились теории о возникновении фиброзной дегенерации мышц, характерной для артрогрипоза, вследствие кислородного голодания плода [SHTURM, 1964; STEINDLER, 1949]. В это же время получила распространение инфекционная теория происхождения патологии, согласно которой инфекционные агенты способны нарушить имплантацию плода и дифференцировку зиготы, если заражение беременной произошло на сроке до 5 недель [Drachman, Coulombre, 1962].

В литературе также появлялись данные о семейных случаях артрогрипоза. Так, в 1955 г. вышла работа с описанием двух пар гомозиготных близнецов, больных врожденным множественным артрогрипозом [LIPTON, MORGENSTERN, 1955]. Кроме того, описаны случаи, когда заболевание проявлялось в трех поколениях подряд. Так, у бабушки, матери и трех внуков наблюдали аномалии коленных и локтевых суставов, типичные для клинической картины артрогрипоза [Pasma, Wildervanck, 1956].

С появлением в 1977 г. метода секвенирования [Sanger, Nicklen, Coulson, 1977] и его распространением, начались исследования, направленные на поиск мутаций в различных генах, которые предположительно приводят к развитию заболевания. Особенно много подобных статей вышло в последние годы, что позволяет проводить анализ наиболее часто встречающихся мутаций и аннотировать замены в базах данных как патогенные, ассоциированные с данным заболеванием. На сегодняшний день в одной из таких баз данных насчитывается 577 замен, аннотированных как способных приводить к возникновению данного патологического состояния [Arthrogryposis - ClinVar - NCBI].

2.2 Патогенез и классификация артрогрипоза

Врожденный множественный артрогрипоз – заболевание, которое характеризуется множественными врожденными контрактурами двух или более суставов. Под термином “контрактура” понимают ограничение объема движений в суставе. Для этого состояния также характерны мышечная гипо- или атрофия и поражения спинного мозга. Одним из симптомов заболевания является замещение мышечной ткани на соединительную или жировую (см. рис. 1) [Skaria, Dahl, Ahmed, 2019].



а

б

Рисунок 1. Гистология скелетных мышц пациентов, больных артрогрипозом; *а* – гипоплазия мышцы, уменьшение ее массы; *б* – замещение мышечной ткани на жировую [Skaria, Dahl, Ahmed, 2019].

По данным литературы частота встречаемости данной аномалии в среднем составляет 1 на 3000 новорожденных [Beckerman, Buchino, 1978; Sells, Jaffe, Hall, 1996; Lee, 2005]. Однако в разных странах отмечаются значительные различия в уровне заболеваемости артрогрипозом. В странах, где эта патология – показание для прерывания беременности, статистика по заболеваемости артрогрипозом значительно ниже. Так, в Финляндии частота встречаемости больных с данной патологией составляет 1 на 3300 новорожденных, в Западной Австралии — 1 на 12000 новорожденных, в Шотландии — 1 на 56000 новорожденных [Darin и др., 2002].

Врожденные контрактуры могут быть подразделены на две группы: изолированные контрактуры и множественные (см. рис. 2). Изолированные затрагивают лишь на одну часть тела. Наиболее распространенная изолированная контрактура – косолапость, которая проявляется с частотой 1 на 500 новорожденных. Термин артрогрипоз используется для описания врожденных множественных контрактур, которые проявляются в двух и более частях тела [Bamshad, Heest Van, Pleasure, 2009]. Артрогрипоз подразделяют на три группы: врожденный множественный артрогрипоз, или амиоплазия, дистальные формы артрогрипоза и врожденные контрактуры суставов при различных синдромах (см. рис. 2) Однако, благодаря работе отечественных исследователей третья группа была признана самостоятельной патологией и больше не относится к артрогрипозу [Баиндурашвили и др., 2014].

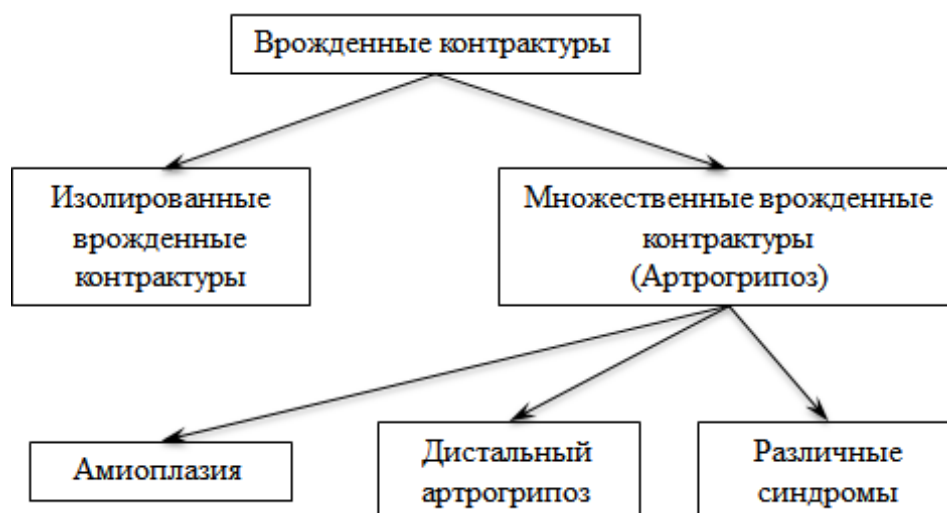


Рисунок 2. Типы врожденных контрактур. Переведено из [Bamshad, Heest Van, Pleasure, 2009] с изменениями

Клинические формы артрогрипоза очень многообразны как по локализации контрактур, так и по тяжести патологического процесса. Амиоплазия, или классический артрогрипоз, характеризуется наиболее серьезными нарушениями и встречается с частотой 1 на 10000

новорожденных, являясь наиболее распространенной формой заболевания [Lowgu и др., 2010].

Показано, что мутации различных генов мышечной, нервной и других тканей приводят к развитию дистального артрогрипоза [Hall, Kimber, Bosse van, 2017]. Данная форма заболевания встречается только в 10% случаев артрогрипоза, однако в различных исследованиях этот показатель варьирует. По этой причине часть данного исследования посвящено поиску патогенных мутаций, способных приводить к данному заболеванию. Широко распространённый метод секвенирования позволяет выявлять мутации, ассоциированные с различными наследственными заболеваниями человека, а также мутации, связанные с предрасположенностью к многофакторным заболеваниям. Поэтому метод секвенирования используется в клиническом медико-биологическом анализе, а также в научных исследованиях, направленных на поиск новых мутаций [Gut, 2013].

Профессор Джудит Г. Холл предложила выделить две основные формы ДА. Первый тип характеризовался только наличием контрактур дистальных участков рук и ног. Пациенты с контрактурами конечностей и дополнительными характерными проявлениями были отнесены ко второму типу и сгруппированы в пять подтипов — ПА-ПЕ (см. *таблица 1*). Пациенты с ДА ПА имеют низкий рост и расщелину неба, или волчью пасть. Для ДА типа ПВ характерными признаками являются оттопыренные уши и птоз (опущение верхнего века), а для типа ПС — заячья губа. Пациенты с дистальными врожденными контрактурами суставов и сколиозом относятся к типу ПД, а с тризмом (ограничение подвижности челюсти) и специфическими контрактурами пальцев — к типу ПЕ.

Таблица 1

Формы дистального артрогрипоза

[Bamshad, Heest Van, Pleasure, 2009; Hall, Kimber, Bosse van, 2017]

Формы ДА по классификации Bamshad	Формы ДА по классификации Hall	Другое название	Отличительные черты
ДА1	ДА типа I	Дигитоталлярный дисморфизм	Контрактуры дистальных областей рук и ног без участия лица или каких-либо дополнительных аномалий

ДА2А		Синдром Фримена-Шелдона	Лицевые аномалии, очень маленький рот, Н-образная ямочка на подбородке
ДА2В		Синдром Шелдона-Холла	Промежуточная форма между ДА1 и ДА2А
ДА3	ДА типа ПА	Синдром Гордона	Волчья пасть, низкий рост
ДА4	ДА типа ПД	Артрогрипоз со сколиозом тяжелой степени	Контрактуры с тяжелым сколиозом
	ДА типа ПС		Заячья губа
ДА5	ДА типа ПВ	Артрогрипоз с глазо-двигательным ограничением	Птоз (опущение верхнего века), ограниченная подвижность глаза
ДА6		Нейросенсорная глухота с артрогрипозной аномалией рук	Нейросенсорная тугоухость
ДА7	ДА типа ПЕ	Синдром трисмус-псевдокамптодактилии, синдром Хехта	Спазм жевательных мышц, который приводит к ограничению подвижности челюсти, контрактуры пальцев, низкий рост
ДА8		Множественный птеригиум-синдром	Множественный птеригиум, низкий рост, сколиоз и характерные аномалии лица
ДА9		Синдром Билса, врожденная контрактурная арахнодактилия	«Мятое» ухо, арахнодактилия (длинные пальцы), деформации стопы

ДА10		Короткое сухожилие в месте прикрепления к пяточной кости	Сгибательные контрактуры стопы
------	--	--	--------------------------------

Американский исследователь Майкл Бамшад расширил классификацию, предложенную Холл – сначала он описал девять различных клинических форм ДА (ДА1-ДА9), а затем в 2006 году описал десятую форму (таблица 1). Форма ДА только с дистальными контрактурами конечностей обозначается также ДА1. Она делится на подтипы ДА1А и ДА1В, которые нельзя отличить клинически. ДА1А вызывает мутация в гене TRPM2 (9-ая хромосома), а ДА1В – мутация в гене MYBPC1 (12-ая хромосома). Формы заболевания, обладающие большим сходством с ДА1, имеют меньший номер: ДА2А и ДА2В (синдромы Фримена-Шелдона и Шелдона-Холла) имеют больше общих признаков с ДА1, чем, например, ДА9 (врожденная контрактурная арахнодактилия) [Bamshad и др., 1996; Daly и др., 2014; Li и др., 2018].

Распространенность отдельных форм ДА неизвестна. Наиболее часто встречаемыми формами ДА являются ДА1 и ДА2В. Для ДА1 характерны сжатые кулаки при рождении, локтевые отклонения кисти, неправильное положение стопы и другие контрактуры конечностей. Синдром Шелдона-Холла (ДА2В) имеет сходство с синдромом Фримена-Шелдона (ДА2А), но течение заболевания проходит легче. Типичными чертами синдрома Фримена-Шелдона являются лицевые аномалии — маленький рот и нос, глубоко расположенные глаза, выступающие носогубные складки и Н-образная ямочка на подбородке. Пациенты с ДА2В имеют треугольное лицо, скошенные книзу глаза, выдающийся подбородок и узкий рот, но они не испытывают проблем с принятием пищи, и им не требуется проведение хирургического вмешательства для увеличения размера ротового отверстия. Кроме того, при синдроме Фримена-Шелдона часто встречается тяжелый сколиоз, который не характерен для синдрома Шелдона-Холла [Bamshad, Jorde, Carey, 1996; Kowalczyk, Feluś, 2016; Li и др., 2018; Баиндурашвили и др., 2014].

ДА типа ПС был исключен из классификации Бамшада, так как эта форма была зарегистрирована только в двух спорадических случаях, а семейные случаи не были описаны [Bamshad, Jorde, Carey, 1996].

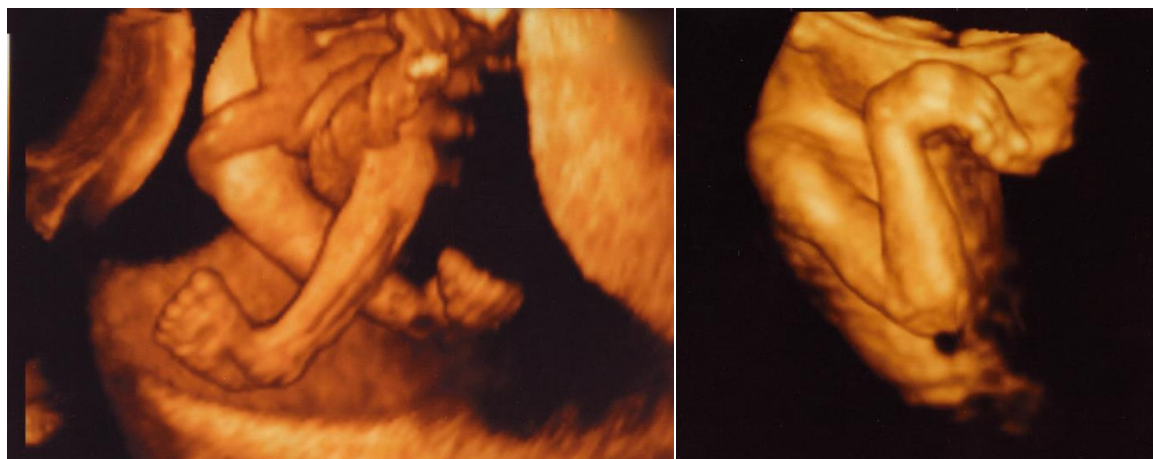
Точная частота встречаемости отдельных форм ДА не известна, это связано с трудностью и неоднозначностью отнесения конкретного случая к определенному типу. Различные формы ДА имеют схожие черты и нечеткие границы, поэтому и фенотипическая

дифференциация этих форм часто затруднена. Так например, маленький рот характерен для форм ДА1, ДА2 и ДА8, а низкий рост описан для случаев ДА1, ДА2, ДА3, ДА7 и ДА8 [Bamshad, Jorde, Carey, 1996; Daly и др., 2014].

Классификация дистальных форм артрогрипоза весьма важна и необходима для правильной постановки диагноза и повышения качества лечения пациентов.

2.3 Методы диагностики и лечение артрогрипоза

Артрогрипоз возникает на ранних стадиях эмбрионального развития, что дает возможность диагностировать заболевание пренатально. Поскольку этиология и патогенез артрогрипоза до конца не изучены и молекулярные маркеры заболевания неизвестны, единственным применимым методом пренатальной диагностики является ультразвуковое исследование. Согласно литературным данным, точность традиционной двумерной эхографии в дородовом выявлении врожденных пороков развития опорно-двигательной системы варьирует от 31 до 65% [Parilla и др., 2003; Goncalves и др., 2004]. Описаны случаи ранней ультразвуковой диагностики артрогрипоза у плода (см. рис. 3) [Стыгар, Храмченко, 2009]. Часто в анамнезе матерей наблюдаются интоксикации, многократные аборт, выкидыши, токсикоз беременности и пр. Также отмечают позднее шевеление плода и слабость его движений.



а

б

Рисунок 3. Эхограмма плода с аномалиями в режиме объемной поверхностной реконструкции. Стрелкой обозначены петли пуповины; *а* - нижние конечности; *б* – верхние конечности. [Стыгар, Храмченко, 2009]

Основными методами диагностики артрогрипоза у детей являются неврологический осмотр, электрофизиологическое исследование и клинико-генетическое исследование для пациентов с дистальными формами артрогрипоза. Неврологический осмотр включает определение силы мышц, рефлексов и выявление признаков поражения головного и

спинного мозга. Электрофизиологическое обследование включает проведение электронейромиографии и позволяет провести дифференциальный диагноз между дистальными формами и амиоплазией [Ассоциация травматологов-ортопедов России, 2013].

Лечение артрогрипотических контрактур и деформаций на сегодняшний день является сложной проблемой детской ортопедии. В связи с недостаточной изученностью этиологии и патогенеза заболевания, единый взгляд на проблему лечения детей страдающих артрогрипозом отсутствует. В литературе данная проблема освещена неполно: в основном встречаются описания единичных клинических случаев и предлагаемых способов их хирургического лечения.

Консервативное лечение включает этапные коррекции деформаций с наложением гипсовых повязок (см. рис. 4), массаж, лечебную физкультуру, физиопроцедуры и ношение специально изготовленных туторов. Терапию следует начинать как можно раньше, поскольку периартикулярные ткани детей раннего возраста лучше поддаются коррекции [Агранович, Баиндурашвили, Петрова, 2012].



Рисунок 4. Коррекция сгибательных контрактур коленных суставов гипсовой повязкой [Агранович, Баиндурашвили, Петрова, 2012]

До настоящего момента специалисты не сошлись в едином мнении о тактике лечения артрогрипоза. Так, вопрос о последовательности устранения деформаций суставов при поражении нескольких несмежных областей до сих пор остается открытым. Часть исследователей придерживается мнения, что коррекцию необходимо начинать с дистальных отделов [Заводовская 1976], тогда как другие настаивают, что в первую очередь необходимо устранять деформации в проксимальных отделах [Розовская, Тер-

Егиазаров, 1973]. Также нет единого мнения о сроках оперативного лечения детей с деформациями верхних и нижних конечностей. Многие авторы считают, что хирургические вмешательства допустимы по достижении пациентов 4-х лет в случае, когда использование других методов консервативной терапии не приносит положительных результатов [Hahn, 1985; Малахов и др., 2003; Розовская, Тер-Егиазаров, 1973]. По мнению других авторов, проводить оперативное лечение таких пациентов целесообразно в возрасте до года [Gibson, Carroll, 1970; Pous, 1981; Mennen и др., 2005;]. Существующие методы лечения являются малоэффективными. Основным результатом консервативной терапии является не полное устранение деформации, а достижение функционально выгодного положения конечностей (см. рис. 5), что нельзя считать удовлетворительным [Бут-Гусаим, 2005]. Также остается актуальной проблема лечения рецидивов деформаций [Петрова, 2008].

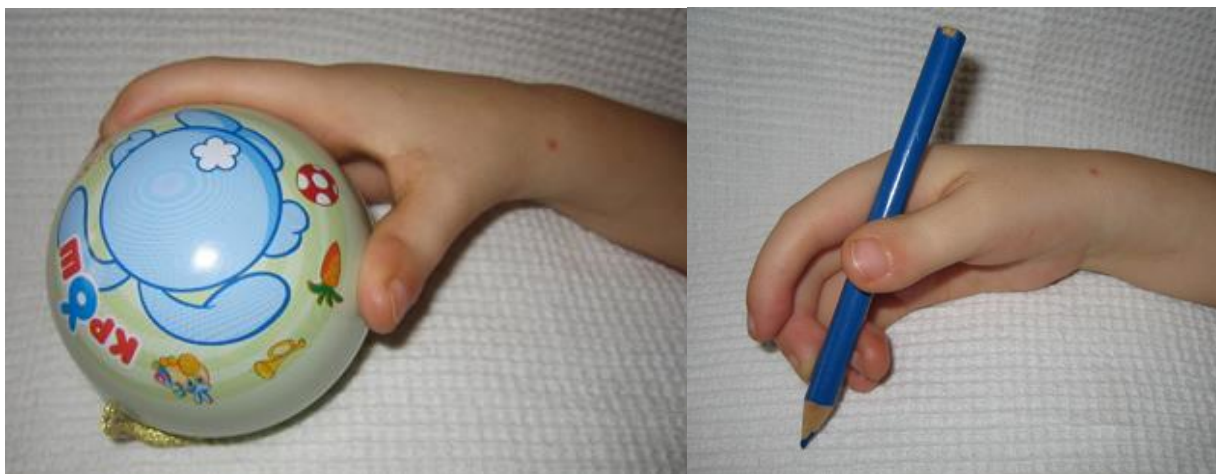


Рисунок 5. Функция верхних конечностей после лечения [Артрогрипоз, лечение артрогрипоза. Ортопедохирургическое лечение артрогрипоза]

Все перечисленное рождает пессимизм и скептицизм исследователей в отношении возможности лечения пациентов с артрогрипозом, что приводит к неоказанию больным адекватной помощи [Бут-Гусаим, 2005]. Часто из-за ложного представления о малой эффективности лечения артрогрипоза пациенты обращаются за помощью в возрасте 10-17 лет, что затрудняет лечение [Баиндурашвили и др., 2014].

Состояние проблемы на сегодняшний день улучшается: все больше исследователей интересуются артрогрипозом, что подтверждается проведением различных конференций и семинаров, посвященных проблеме лечения и изучения данного заболевания, появлением узкопрофильных отделений в научно-исследовательских учреждениях. Так, в 2007 году в Бирмингеме (Великобритания) был проведен 1-й Международный симпозиум по Артрогрипозу, объединивший пациентов, их семьи и многонациональную группу

экспертов в области лечения и исследования артрогрипоза [Lester и др., 2017]. В 2010 году в научно-исследовательском детском ортопедическом институте им. Г.И. Турнера было создано специализированное отделение по лечению пациентов, больных артрогрипозом, где в период с 2010 по 2013 г. было пролечено порядка 500 детей, страдающих данной патологией [Клиника артрогрипоза Институт им. Г.И.Турнера Минздрава РФ]. По инициативе главы отделения 2-й Международный симпозиум по Артрогрипозу был проведен в Санкт-Петербурге (Россия) в 2014 году [Hall и др., 2015]. В 2018 году в Филадельфии (США) прошел 3-й Международный симпозиум по Артрогрипозу, в котором приняли участие 140 специалистов из 16 стран [Dahan-Oliel и др., 2019].

3. Материалы и методы

3.1 Список реактивов

10X Taq буфер	Евроген, Россия
3-[(3-холамидопропил) диметиламмоний]-1-пропансульфат (CHAPS, ЧАПС)	Fisher Bio Reagents, США
N-N'-метилден-бис-акриламид (>99%)	Helicon, Россия
Taq-полимераза	Евроген, Россия
β -меркаптоэтанол ($\geq 99\%$)	Ferak, Германия
Агароза	HydraGene, Co. Ltd., США, Китай
Акриламид ($\geq 99\%$)	Helicon, Россия
Альбумин бычий сывороточный (БСА)	Sigma-Aldrich, Германия
Амфолит Bio-Lyte 3/10 40%	BioRad, США
Ацетонитрил ($\geq 99,95\%$)	Honeywell, Германия
Белковый маркер (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, кат.номер 26623)	Thermo Fisher Scientific, США
Бромфеноловый синий	Amresco, США
Бычий сывороточный альбумин (БСА)	Fermentas, США
Глицерин (> 99,5%)	Helicon, Россия
Глицин (>99%)	GE Healthcare, США
Дитиотреитол (ДТТ)	Promega, США
Додecilсульфат натрия (DDC-Na)	Вектон, Россия
Йодацетамид	BioRad, США
Кумасси R-250	Биолот, Россия
Масло минеральное	BioRad, США

Мочевина (> 99,5%)	BioRad, США
Набор реактивов Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymoresearch, США
Набор 3Dye™ 2D DIGE kit	Lumiprobe, Россия
Наборы реактивов Quick-DNA™ Plus Kit	Zymoresearch, США
Натрий-фосфатный буфер (англ. Phosphate buffered saline, PBS)	Биолот, Россия
Персульфат аммония (ПСА) (ос.ч.)	Helicon, Россия
Реактив Брэдфорда (Coomassie G250)	SARSTEDT AG & Co, Германия
Смесь 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (dNTP)	Евроген, Россия
Смесь ингибиторов протеаз cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Германия
Стрипы для изоэлектрофокусирования ReadyStrip™ IPG, 7 см, pH 3–10	BioRad, США
Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) (~99%)	Helicon, Россия
Тиомочевина (≥99%)	Sigma-Aldrich, Германия
Трис(гидроксиметил)аминометан (≥99.8%)	Sigma-Aldrich, Германия
Этидий бромид	Amresco, США

Образцы крови и мышечной ткани, полученной во время хирургических операций, были любезно предоставлены коллегами из ФГБУ "Научно-исследовательский детский ортопедический институт имени Г.И. Турнера" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

3.2 Список материалов и оборудования

Оборудование для электрофореза

Прибор для изоэлектрофокусирования HARVARD BIOSCIENCE, INC, США
Hoefer IEF100

Прокладки для электродов для BioRad, США
изоэлектрофокусирования

Подложки i12 для Bio-Rad, США
регидратации/уравновешивания, 7 см

Электрофоретическая ячейка Mini- Bio-Rad, США
PROTEAN 3

Источник тока PowerPac™ Basic Power Bio-Rad, США
Supply

Система гель-документирования Bio-Rad, США
ChemiDoc™

Лазерный сканер Typhoon FLA9500 GE Healthcare, США

Трансиллюминатор TCP-20 MC Vilber Lourmat, Франция

Термостат

Термостат с функцией охлаждения и Biosan, Латвия
нагрева CH-100

Шейкер

Платформенный шейкер-качалка Sky Line ELMI, Латвия

Спектрофотометры

Спектрофотометр NanoPhotometer™ P-Class Implen, Германия

Спектрофотометр СФ46 Ломо, Россия

Весы

Лабораторные весы CAS CBX-12KH	CAS Corporation, Южная Корея
--------------------------------	------------------------------

Центрифуги

Центрифуга miniSpin plus	Eppendorf, Германия
--------------------------	---------------------

Центрифуга UNION 5KR	Hanil, Корея
----------------------	--------------

Ультразвуковое устройство

Ультразвуковой процессор UP50H	Hielscher, Германия
--------------------------------	---------------------

Масс-спектрометр и система ЖХ

Гибридный квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр Agilent 6538 UHD	Agilent Technologies, США
---	---------------------------

Хроматографическая система Agilent 1260	Agilent Technologies, США
---	---------------------------

Колонка Zorbax 300SB-C18	Agilent Technologies, США
--------------------------	---------------------------

Оборудование для ПЦР

Амплификатор T-100 Thermal Cycler	Bio-Rad, США
-----------------------------------	--------------

Список программного обеспечения

SnapGene Viewer	GLC Biotech, США
-----------------	------------------

Spectrum Mill MS Proteomic Workbench (Rev B.04.00.127)	Agilent Technologies, США
--	---------------------------

3.3 Подбор пациентов

Для экзомного секвенирования и секвенирования по Сэнгеру было отобрано 33 образца крови пациентов, 2 из которых страдают врожденным множественным артрогрипозом (амиоплазией), а остальные – дистальными формами артрогрипоза. Также были взяты образцы крови у 4 родителей пациентов.

Для выявления белков, специфичных для патологического состояния, были отобраны пациенты с диагнозом врожденный множественный артрогрипоз и индивидуумы без артрогрипоза. Пациентов отбирали по полу (женский) и месту забора материала (Musculus quadriceps femoris, четырехглавая мышца бедра). Информация по пациентам представлена в таблице 2.

Физические параметры пациентов, оперативный материал мышечной ткани которых был использован в исследовании

Пациент №1	Пол: жен Возраст: 4 года Материал: <i>Musculus quadriceps femoris</i> Диагноз: ВМА
Пациент №2	Пол: жен Возраст: 16 лет Материал: <i>Musculus quadriceps femoris</i> Диагноз: ВМА
Контроль №1	Пол: жен Возраст: 9 лет Материал: <i>Musculus quadriceps femoris</i> Диагноз: врожденная деформация проксимального отдела бедренной кости
Контроль №2	Пол: жен Возраст: 15 лет Материал: <i>Musculus quadriceps femoris</i> Диагноз: дисплазия

3.4 Получение экстрактов мышечной ткани [Rabilloud, 1996]

Растворы

- 1) Натрий-фосфатный буфер (НФБ) 0,01 моль/литр
- 2) Лизирующий буфер: мочеви́на 7 моль/литр, тиомочеви́на 2 моль/литр, 4% ЧАПС, 1% ДТТ.

Ткань измельчали с помощью хирургических ножниц и замораживали в жидком азоте. Далее замороженную ткань растирали с помощью пестика. Процедуру повторяли до

гомогенного состояния ткани. В эппендорф с тканью добавляли 300 мкл натрий-фосфатного буфера (НФБ) в концентрации 0,01 моль/л и центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g. Супернатант отбирали в чистый эппендорф. К осадку добавляли 250 мкл лизирующего буфера, 2,5 мкл ингибиторов протеаз и 5 мкл амфолитов. Для разрушения клеточных мембран ткань замораживали в азоте, а затем оттаивали в термостате при 37°C. Процедуру повторяли три раза, перед новым циклом пробы вортиксировали. Для обработки ультразвуком образцы переносили в пробирки на 15 мл и погружали в заранее измельченный лед в спирте. Волновод прибора погружали в препарат. Экстракты обрабатывали ультразвуком на мощности 20% в течение 3 мин. Использовали циклы 5:10 (5 с обработки, 10 с охлаждения). Полученный лизат тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g. Супернатант отбирали в чистый эппендорф.

3.5 Измерение концентрации белка методом Бредфорда [Bradford, 1976]

Концентрацию белков в полученных экстрактах измеряли с помощью спектрофотометра с использованием коммерческого реактива Бредфорда. Анализ проводили в кюветах. Для построения калибровочной кривой были использованы стандартные растворы бычьего сывороточного альбумина с известной концентрацией белка: 0,125; 0,25; 0,5; 1 и 1,5 мг/мл. К 25 мкл образца добавляли 1,25 мл реактива Бредфорда. Поглощение проб измеряли при длине волны 595 нм. Концентрацию вычисляли по среднему арифметическому результатов трех измерений.

3.6 Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na [U. K. Laemmli, 1970]

Растворы

- 1) Концентрирующий гель 5%: акриламид/N-N'-метилен-бис-акриламид (АА/БисАА) 5%: трис-НСl pH 6,8 0,13 моль/литр, додецилсульфат натрия (ДДС-Na) 0,1%, ПСА 0,1%, ТЕМЕД 0,08%.
- 2) Разделяющий гель 12%: АА/БисАА 12%, трис-НСl pH 8,8 0,375 моль/литр, ДДС-Na 0,1%, ПСА 0,1%, ТЕМЕД 0,08%.
- 3) Буфер для нанесения проб: 8% ДДС-Na, трис-НСl pH 6,8 260 ммоль/литр, 4% ДТТ, 40% глицерин, 1% БФС.
- 4) Трис-глициновый ДДС-Na буфер (ТГБ): трис 25 ммоль/литр, глицин 192 ммоль/литр, ДДС-Na 0,1%.
- 5) Раствор для фиксации: этанол 40%, уксусная кислота 10%.

- 6) Раствор для регидратации: мочевины 7 моль/литр, тиомочевина 2 моль/литр, 2% ЧАПС, 0,3% ДТТ, 0,5% амфолит, 1% ингибиторы протеаз, экстракт в лизирующем буфере.
- 7) Минеральное масло
- 8) Уравновешивающий буфер 1: мочевины 6 моль/литр, трис-НСl pH 6,8, 50 ммоль/литр, 2% ДДС-N, 30% глицерин, 3% ДТТ.
- 9) Уравновешивающий буфер 2: мочевины 6 моль/литр, трис-НСl pH 6,8, 50 ммоль/литр, 2% ДДС-Na, 30% глицерин, 2,5% йодацетамид.
- 10) Агароза 1%

3.6.1 Одномерный электрофорез

Для анализа экстрактов мышечной ткани был проведен одномерный электрофорез в 12% полиакриламидном геле по методу Лэммли. Пробы, содержащие 5, 10, 15 и 20 мкг белка инкубировали с β -меркаптоэтанолом в течение 15 мин при 100°C, далее вносили буфер для нанесения и загружали в лунки геля. В крайние и центральные лунки наносили белковый маркер молекулярных масс. Электрофорез проводили при напряжении 180 В в течение 40 мин, после чего фиксировали гели в растворе для фиксации в течение 15 мин и окрашивали Кумасси R250 (см. пункт 3.6).

3.6.2 Двумерный электрофорез

Изоэлектрофокусирование

Для регидратации стрипы помещали в раствор, содержащий мочевины, тиомочевину, ЧАПС, ДТТ, амфолиты, ингибиторы протеаз и экстракт в лизирующем буфере, и инкубировали в течение 14 часов при 6°C.

Изоэлектрофокусирование проводили на приборе Hoefer IEF100. Использовали следующие настройки: максимальная сила на один стрип не превышала 50 мА, напряжение не более 4000V, общее количество вольт-часов 10000. Изоэлектрофокусирование проводили при 20°C, после чего стрипы хранили при температуре -80°C.

Электрофорез

Стрипы последовательно инкубировали в двух буферах (уравновешивающий буфер 1, уравновешивающий буфер 2) в течение 15 мин при комнатной температуре. Далее стрипы вносили на гель и фиксировали расплавленной агарозой. Гели погружали в электрофоретическую камеру с ТГБ и подключали к источнику тока. Электрофорез проводили при напряжении 150 В. По завершении гели извлекали из стекол и инкубировали в растворе для фиксации в течение 15 минут. Визуализацию проводили с помощью окрашивания Кумасси R250.

3.6.3 2D DIGE

Конъюгация образцов с флуоресцентными метками

Образцы, содержащие 5 мкг белка, инкубировали в течение 30 мин в темноте на льду с активированными эфирами флуоресцентных красителей из набора, разработанного для двумерного электрофореза, в различных комбинациях. Были использованы следующие красители: цианин 2 (Cyanine 2, Cy2), цианин 3 (Cyanine 3, Cy3) или цианин 5 (Cyanine 5, Cy5). Раствор для мечения содержал 500 пмоль каждого красителя, растворенного в диметилформамиде. Реакцию останавливали путем добавления 10 мкмоль лизина с последующей инкубацией в темноте в течение 10 мин при 0°C.

Двумерный электрофорез

Последующее разделение белков в двух направлениях проводили как описано в пункте 3.6.2.

3.6.4 Окрашивание гелей Кумасси

Растворы

1) Раствор для окрашивания: краситель Кумасси R250 0,25%, этанол 45%, уксусная кислота 10%.

2) Раствор для отмывки: уксусная кислота 5%.

Гели помещали в раствор для окрашивания и плавно перемешивали на качалке в течение 3 часов. Излишки красителя удаляли трехкратной инкубацией в растворе для отмывки в течение 15 мин. Визуализацию и фотографирование проводили в системе геледокументирования ChemiDoc™.

3.7 Трипсинолиз белка в геле

Растворы

1) Бикарбонат аммония 1 моль/литр

2) Бикарбонат аммония 25 ммоль/литр

3) Раствор ацетонитрила 1: ацетонитрил 50%, бикарбонат аммония 25 ммоль/литр.

4) Раствор ацетонитрила 2: ацетонитрил 50%, трифторуксусная кислота 0,1%.

5) Раствор трипсина: трипсин 0,8 мкмоль/литр, ацетонитрил 25 ммоль/литр.

Фрагменты геля, содержащие белки интереса, вырезали помощью скальпеля, измельчали и помещали в пробирку типа эппендорф. К образцу добавляли 200 мкл раствора ацетонитрила 1 и инкубировали в течение 10 мин, интенсивно перемешивая с помощью платформенного шейкера. Супернатант удаляли и повторяли процедуру 3 раза. Чтобы дегидратировать ПААГ, к образцам добавляли 100 мкл ацетонитрила и инкубировали в течение 10 мин при интенсивном перемешивании. Далее удаляли излишки ацетонитрила и

сушили образцы под вакуумом в течение 15 минут. К высушенным образцам добавляли 25 мкл раствора трипсина и инкубировали на льду в течение 45 мин. Невпитавшийся раствор удаляли и вносили 50 мкл раствора трипсина, интенсивно перемешивали и инкубировали в течение 14 часов при 37 °С. Надосадочную жидкость собирали и переносили в чистую пробирку. К фрагментам геля добавляли 50 мкл раствора ацетонитрила 2 и инкубировали в течение 15 мин, интенсивно перемешивая. Процедуру повторяли дважды. Образцы подсушивали под вакуумом до объема 10 мкл.

3.8 Хромато-масс-спектрометрический анализ

Полученные триптические пептиды анализировали с помощью квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра с ионизацией в электроспрее Agilent ESI-Q-TOF 6538 UHD, совмещенного с высокоэффективной жидкостно-хроматографической системой Agilent 1260. Разделение пептидов проводили в системе вода-ацетонитрил в присутствии 0,1% муравьиной кислоты (элюэнт А – 5% ацетонитрил, содержащий 0,1% муравьиную кислоту; элюэнт В – 90% ацетонитрил, содержащий 0,1% муравьиную кислоту) в градиенте ацетонитрила (от 5% до 60% фазы В за 25 минут и до 100% фазы В за 5 минут) на колонке Zorbax 300SB-C18, Agilent Technologies (размер частиц 5 мкм, размер пор 300 Å, внутренний диаметр 0,5 мм, длина 150 мм) со скоростью потока 15 мкл/мин. Анализ ионов проводили с частотой 3 спектра в секунду в режиме автоматического тандемного MS/MS-анализа с материнскими ионами 2+, 3+, n+. Анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения Spectrum Mill MS Proteomic Workbench Rev B.04.00.127; Agilent Technologies по базе данных SwissProt2017. Поиск осуществлялся по MS/MS спектрам по стандартному протоколу.

3.9 Выделение ДНК из крови

Для выделения ДНК из крови использовали наборы реактивов Quick-DNA™ Plus Kit. Выделение производилось по протоколу, рекомендованному производителем [Quick-DNA™ Midiprep Plus Kit].

3.10 Экзомное секвенирование

Экзомное секвенирование проводилось коллегами из Казанского (Приволжского) федерального университета.

3.11 Постановка ПЦР

Для подбора праймеров использовали электронный ресурс PrimerQuest Tool (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Анализ специфичности олигонуклеотидов проводили с помощью сервиса BLAST на сайте национального центра

биотехнологической информации США (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализ химических свойств олигонуклеотидов осуществляли, используя инструмент OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Выбранные олигонуклеотиды были синтезированы в компании «Евроген» (Санкт-Петербург, Россия). Последовательности праймеров и их характеристики представлены в разделе «Результаты и обсуждения».

Приготовление раствора для ПЦР. В пробирку типа эппендорф (1,5 мл) вносили дистиллированную воду, Taq буфер, смесь 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (dNTP), MgCl₂, прямой и обратный праймер в соответствии с таблицей, перемешивали с помощью вортекса. В микропробирки для ПЦР вносили 23,8 мкл раствора для ПЦР. Далее в каждую пробирку добавляли ДНК пациента, Taq-полимеразу (в соответствии с таблицей 3). Общий объем смеси составил 25 мкл.

Таблица 3

Компоненты полимеразной цепной реакции

Компонент	Объем на одну реакцию, мкл	Конечная концентрация
H ₂ O	9,3	
10X Taq буфер	2,5	1x
Смесь dNTP	2,5	0,2 ммоль/л
MgCl ₂	1,5	1,5 ммоль/л
Прямой праймер	4	0,16 мкмоль/л
Обратный праймер	4	0,16 мкмоль/л
ДНК-матрица	1	
Taq-полимераза	0,2	0,05 ед.акт/мкл

Микропробирки для ПЦР помещали в амплификатор, выставляли параметры цикла амплификации.

Температурный режим ПЦР

Температура, °C	Время, мин:с	Количество циклов
95	3:00	1
95	0:30	5
62	0:30	
72	0:30	
95	0:30	5
61	0:30	
72	0:30	
95	0:30	35
60	0:30	
72	0:30	
95	2:00	1
72	2:00	
25	∞	

3.12 Электрофорез в агарозном геле

Растворы

1) Трис-ацетатный буфер 1x pH 7,6 (от англ. Tris-acetate-EDTA, TAE): трис 40 ммоль/литр, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, EDTA) 1 ммоль/литр, уксусная кислота 3 ммоль/литр

2) Бромистый этидий 0,5 мкг/мл

Полученные ПЦР-фрагменты очищали методом электрофореза в 2% агарозном геле. Гель после заливки охлаждали до 4°C и погружали в электрофоретическую кювету с буфером TAE. В микропробирки с ампликоном добавляли 7,5 мкл буфера для нанесения, после чего наносили в лунку 30 мкл образца. Кювету закрывали крышкой и подключали к источнику тока. Электрофорез проводили при напряжении 80 В в течение 1,5 часов.

По окончании электрофореза гель помещали в кювету с бромистым этидием и плавно перемешивали в течение 15 минут с помощью платформенного шейкера-качалки. Визуализацию в ультрафиолете производили с помощью трансиллюминатора.

3.13 Выделение ДНК из геля

Выделение ДНК из геля проводили с помощью набора реактивов Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. Выделение производилось по протоколу, рекомендованному производителем [Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit Catalog Nos. D4001T, D4001, D4002, D4007 & D4008].

3.14 Измерение концентрации ДНК

Концентрацию очищенной ДНК измеряли с помощью спектрофотометра. Детекцию проводили при длине волны, равной 260 нм. В качестве референсного образца использовали буфер для элюции (DNA Elution Buffer) из набора реактивов для выделения ДНК из геля Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit.

3.15 Секвенирование

Секвенирование методом Сэнгера [Sanger, Nicklen, Coulson, 1977] проводилось в ресурсном центре СПбГУ сотрудниками университета.

3.16 Анализ хроматограмм

Хроматограммы визуализировали и анализировали с помощью программы SnapGene Viewer.

4. Результаты и обсуждение результатов



Рисунок 6. Общая схема эксперимента анализа белков мышечной ткани пациентов, больных артрогрипозом, и индивидуумов без артрогрипоза

Из ткани мышц пациентов, больных артрогрипозом, и индивидуумов без артрогрипоза (контроль), были получены тотальные экстракты белка. Концентрацию белка в экстрактах мышц определяли по методу Бредфорда [Bradford, 1976]. Результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5

Результаты определения концентрации белка в экстрактах мышечной ткани

Экстракт	Концентрация белка, мг/мл
Контроль №1	7,6
Контроль №2	21
Пациент №1	2,8
Пациент №2	7,6

Как видно из таблицы, концентрация белка в полученных образцах колеблется в диапазоне от 2,8 до 21 мг/мл. Различия в концентрациях наблюдаются как между пациентами, так и между контролями, следовательно, они не могут быть обусловлены заболеванием. Вероятнее всего, отличия связаны с количеством использованного для выделения операционного материала и его качеством.

Экстракты, полученные из мышечной ткани контролей №1 и №2, а также пациента №2 были охарактеризованы с помощью одномерного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na. Каждую пробу наносили на дорожки геля в количестве 5, 10, 15 и 20 мг:

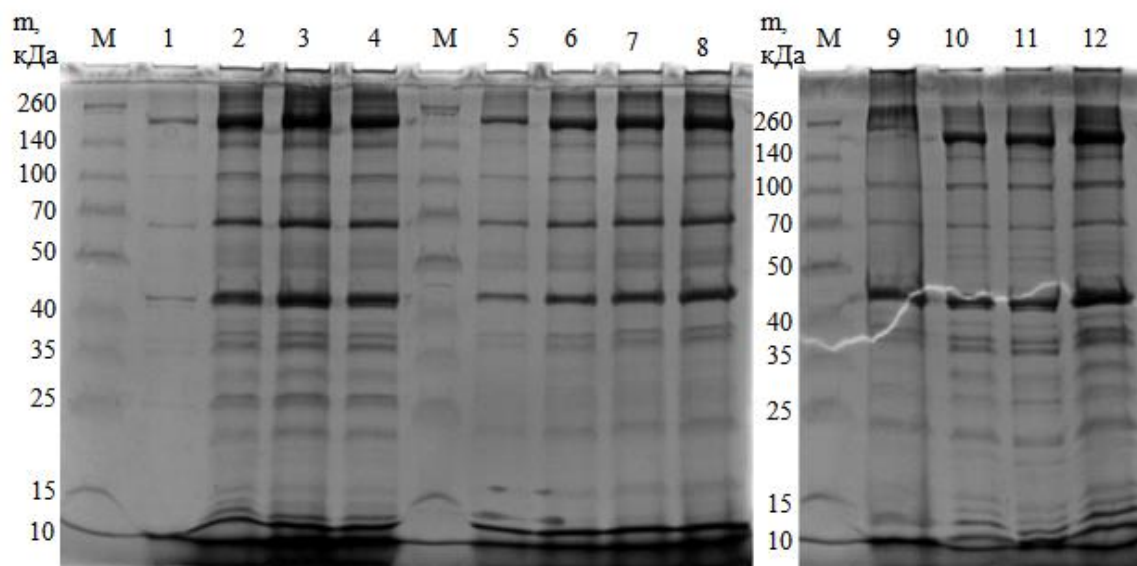


Рисунок 7. Электрофореграмма одномерного электрофореза общего белка, выделенного из оперативного материала мышечной ткани. Разделение проводили в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии ДДС-Na

1-4 – белковый экстракт из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №1; 5, 10, 15 и 20 мкг соответственно

5-9 – белковый экстракт из мышц пациента №2, больного артрогрипозом; 5, 10, 15 и 20 мкг соответственно

9-12 – белковый экстракт из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №2; 5, 10, 15 и 20 мкг соответственно

М – белковый маркер молекулярных масс

Как видно из рисунка 7, 10 мкг белка являются оптимальными для данного метода визуализации. Во всех пробах преобладают белковые фракции с молекулярной массой ≈ 200 кДа, ≈ 70 и ≈ 45 кДа. С помощью одномерного электрофореза были выявлены отличия в белковом профиле проб, полученных из мышечной ткани контроля №2: белковые зоны массой ≈ 130 кДа значительно менее яркие, количество белка с данной молекулярной массой ниже, чем в остальных образцах.

Хотя одномерный электрофорез позволяет оценить молекулярные массы преобладающих белковых фракций, тотальные белковые экстракты, в данном случае экстракты мышечной ткани, плохо поддаются разделению с помощью этой методики. Двумерный электрофорез

является более информативным методом, поскольку разделение белков идет сначала по заряду согласно их изоэлектрической точке, а затем по молекулярной массе. Полученные тотальные экстракты белков из мышц были проанализированы двумерным электрофорезом в ПААГ в присутствии ДДС-Na. Использовали 500 мкг белка. Визуализацию проводили с помощью окрашивания Кумасси R-250.

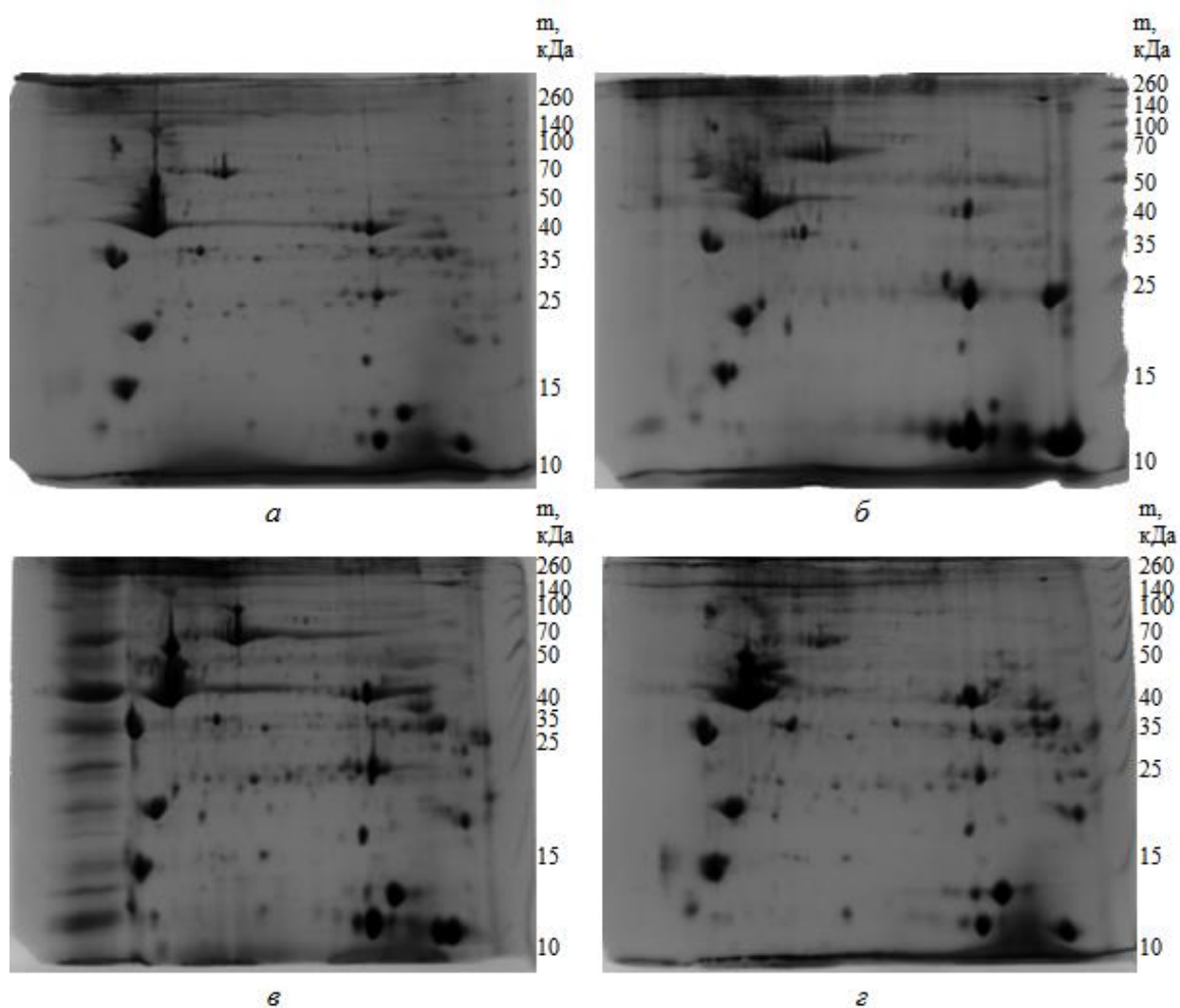


Рисунок 8 Электрофореграмма двумерного электрофореза общего белка, выделенного из оперативного образца мышечной ткани. Электрофорез проводили в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na. Для определения молекулярных масс был использован белковый маркер (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder), Thermo Fisher Scientific, США

а – белковый экстракт из мышц пациента №1, больного артрогрипозом;

б – белковый экстракт из мышц пациента №2, больного артрогрипозом;

в – белковый экстракт из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №1

г – белковый экстракт из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №2

На рисунке 8 представлены результаты двумерного электрофореза белковых экстрактов 2 пациентов, больных артрогрипозом, и 2 индивидуумов без артрогрипоза. Из электрофореграмм видно, что на всех гелях преобладает белковая фракция с молекулярной массой ≈ 45 кДа и изоэлектрической точкой ≈ 4 . Другая группа мажорных белков имеет массу ≈ 13 кДа и изоэлектрическую точку ≈ 9 . Также видно, что все электрофореграммы отличаются между собой. Особенно сильно выделяется электрофореграмма б, на ней визуализируется меньше всего белковых фракций. Противоположная картина наблюдается на рисунке 8, в: здесь окрасилось большое количество пятен. Хотя метод двумерного электрофореза в полиакриламидном геле позволяет выявить отличия белковых фракций, определить приблизительные молекулярные массы и изоэлектрические точки различных белков, с помощью этого метода нельзя достоверно их определить.

Для идентификации дифференциальных белков был использован хромато-масс-спектрометрический анализ. Были проанализированы мажорные белки и некоторые белковые фракции, найденные на электрофореграмме общего белка, выделенного из ткани индивидуумов без артрогрипоза, но не обнаруженные на электрофореграмме общего белка, полученного из мышц пациентов, больных артрогрипозом (см. рис. 9). Выбранные белки были вырезаны, подвергнуты трипсинолизу и проанализированы с помощью с помощью квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра, совмещенного с высокоэффективной жидкостной хроматографией. Результаты анализа изложены в таблицах 7 и 8 в приложении.

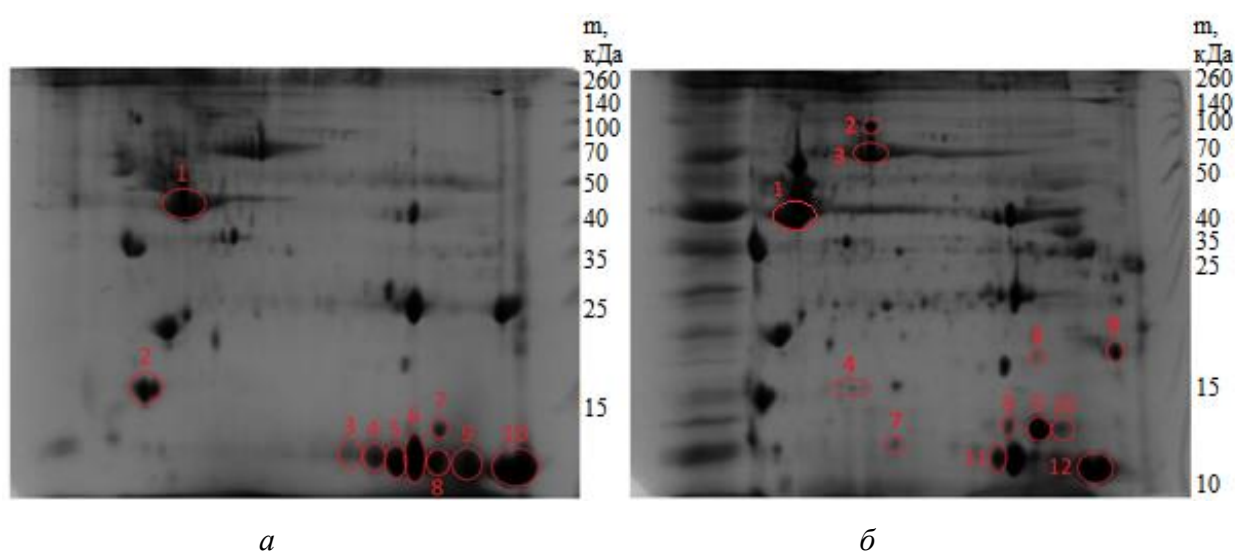


Рисунок 9. Электрофореграмма двумерного электрофореза общего белка, выделенного из оперативного образца мышечной ткани. Электрофорез проводили в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na. Для определения молекулярных масс был использован

белковый маркер (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder), Thermo Fisher Scientific, США. Номерами отмечены белки, идентифицированные с помощью масс-спектрометрии *а* – белковый экстракт из мышц пациента №2, больного артрогрипозом;

1 - α -скелетный актин; 2 - легкая цепь миозина 2; 4 - бета-субъединица гемоглобина; 5 - бета-субъединица гемоглобина, дельта-субъединица гемоглобина, альфа-субъединица гемоглобина; 6 - бета-субъединица гемоглобина, дельта-субъединица гемоглобина; 7 – миоглобин; 9 - бета-субъединица гемоглобина; 10 - альфа-субъединица гемоглобина

б – белковый экстракт из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №1

1 - α -скелетный актин; 2 - сывороточный альбумин; 3 - сывороточный альбумин; 4 - кофилин-2; 5 - карбоангидраза-3; 6 - аденилаткиназа-1; 7 - тропонин I скелетной мускулатуры; 8 – миоглобин; 9 – миоглобин; 11 - бета-субъединица гемоглобина; 12 - альфа-субъединица гемоглобина.

Превалирующий белок с молекулярной массой ≈ 45 кДа и изоэлектрической точкой ≈ 4 на обеих электрофореграммах по результатам масс-спектрометрического анализа был идентифицирован как α -скелетный актин. Поскольку этот белок присутствует на всех электрофореграммах в дальнейшем его можно использовать как дополнительный маркер молекулярной массы и изоэлектрической точки. Белок 2 и 3 с электрофореграммы *б* был определен как сывороточный альбумин. Вероятнее всего, это произошло, поскольку белковые фракции являются изоформами и при расщеплении образуют одни и те же протеолитические фрагменты. Аналогичную ситуацию мы наблюдаем с белками 4, 5, 6 и 9 из мышц пациента №2, которые были идентифицированы как бета-субъединицы гемоглобина, а также белками 8 и 9 из мышечной ткани индивидуума без артрогрипоза (контроля) №1, которые определены как миоглобин. На обеих электрофореграммах группа мажорных белков с молекулярной массой ≈ 13 кДа и изоэлектрической точкой ≈ 9 определяется как различные субъединицы гемоглобина и миоглобин.

Для анализа были выбраны некоторые белки, обнаруженные в белковых экстрактах из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №1, но не найденные при анализе электрофореграммы белков из мышц пациента №2, больного артрогрипозом. Это белки 4, 5, 6 и 7. Они были идентифицированы как кофилин-2, карбоангидраза-3, аденилаткиназа-1 и тропонин I скелетной мускулатуры соответственно. Наибольший интерес представляют кофилин-2 и тропонин I скелетной мускулатуры, поскольку их повреждение или отсутствие могут влиять на работу и состояние мышечной ткани в целом. Кофилин-2, или мышечный кофилин, относится к семейству белков, участвующих в реорганизации актина [McGough и др., 1997]. Тропонин I скелетной мускулатуры также взаимодействует с

актином, удерживая таким образом тропонин-тропомиозиновый комплекс на месте. Он также служит ингибитором актомиозиновой Mg-АТФазы, препятствует взаимодействию актина и миозина, когда ионы кальция не связаны с тропонином [Brown, Cohen, 2005]. Также показана взаимосвязь изменения белка и возникновения артрогрипоза [Robinson и др., 2007].

Белковые фракции 3 и 8 из мышц пациента №2 и белок 10 из мышечной ткани индивидуума без артрогрипоза (контроля) №1 не удалось идентифицировать. Области, занимаемые белками 3 и 10 довольно светлые, предположительно, белка было недостаточно для анализа. Также, возможно, анализ не удался из-за ошибок пробоподготовки этих образцов.

Сравнение электрофореграмм двумерного электрофореза общего белка, выделенного из цельной ткани крайне затруднительно. Наличие большого количества различных белковых фракций затрудняют анализ, поскольку при наложении они плохо совмещаются, что затрудняет поиск аналогичных белков на разных электрофореграммах. Метод двумерного дифференциального электрофореза (2D DIGE) решает эту проблему, поскольку при таком анализе пробы, меченные различными красителями, находятся на одном геле [Issaq, Veenstra, 2008; Ünlü, Morgan, Minden, 1997]. Нами был проведен дифференциальный электрофорез белковых экстрактов двух пациентов, больных артрогрипозом, и двух индивидуумов без артрогрипоза. Схема нанесения образцов на гели представлена в таблице 6.

Таблица 6

Схема эксперимента

	Гель №1	Гель №2	Гель №3
Контроль №1	Су-5		Су-3
Контроль №2	Су-2	Су-5	
Пациент №1	Су-3	Су-2	
Пациент №2		Су-3	Су-5
Пациент №2 + Контроль №1			Су-2

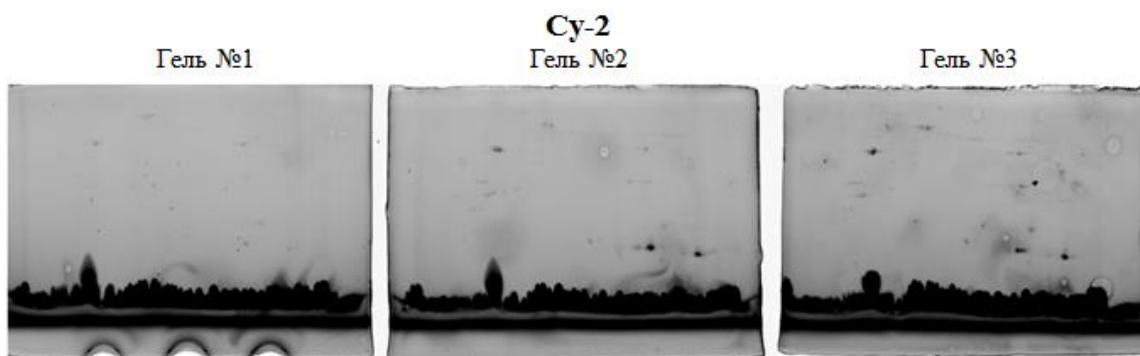


Рисунок 10. Электрофореграммы двумерного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na, 5 мкг, визуализация по каналу Су-2

Гель: №1 – белковый экстракт из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №2

Гель №2 – белковый экстракт из мышц пациента №1, больного артрогрипозом;

Гель №3 – белковый экстракт из мышц пациента №2, больного артрогрипозом и белковый экстракт из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №1

Электрофореграммы, представленные на рисунке 10, содержат несколько белковых фракций. Предыдущий анализ двумерных электрофореграмм белковых экстрактов мышечной ткани тех же пациентов, окрашенных Кумасси, показывает, что в пробах содержится гораздо больше различных белковых зон. Отсюда следует, что в данном случае краситель плохо связался с белками образцов. Дальнейшая обработка по данному каналу невозможна. Предположительно, это произошло, поскольку при пробоподготовке был использован натрий-фосфатный буфер, который неспецифически за счет гидрофобных взаимодействий связывается с белками, и, вероятно, препятствует мечению.

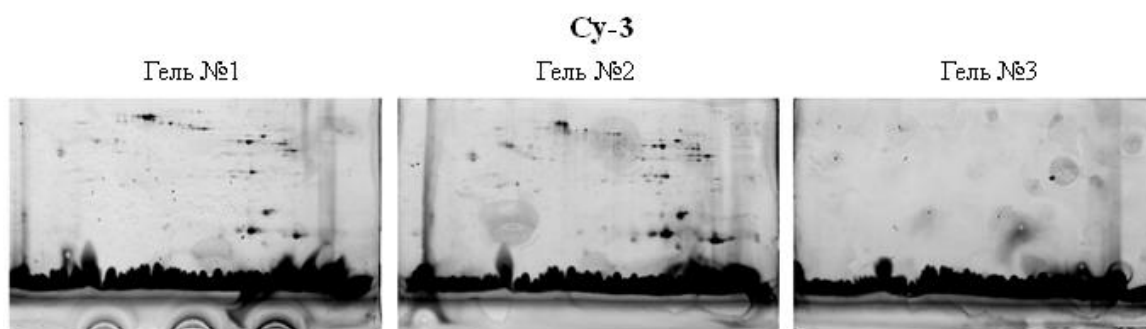


Рисунок 11. Электрофореграммы двумерного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na, 5 мкг белка, визуализация по каналу Су-3

Гель №1 – белковый экстракт из мышц пациента №1, больного артрогрипозом;

Гель №2 – белковый экстракт из мышц пациента №2, больного артрогрипозом;

Гель №3 – белковый экстракт из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №1
 Как видно из рисунка 11, разделение в геле №3 не прошло. Дальнейший анализ данного геля невозможен.

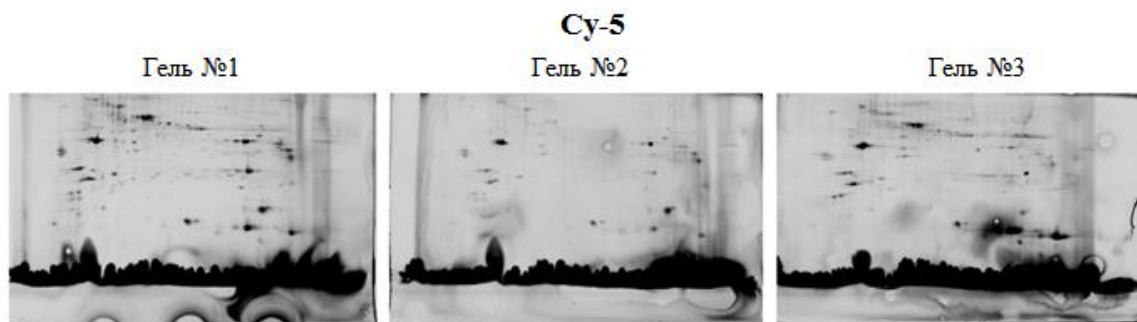


Рисунок 12. Электрофореграммы двумерного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na, 5 мкг белка, визуализация по каналу Cy-5

Гель: №1 – белковый экстракт из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №1;

Гель №2 – белковый экстракт из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №2;

Гель №3 – белковый экстракт из мышц пациента №2, больного артрогрипозом

По результатам проделанной работы были составлены два композита: гель №1 и гель №2

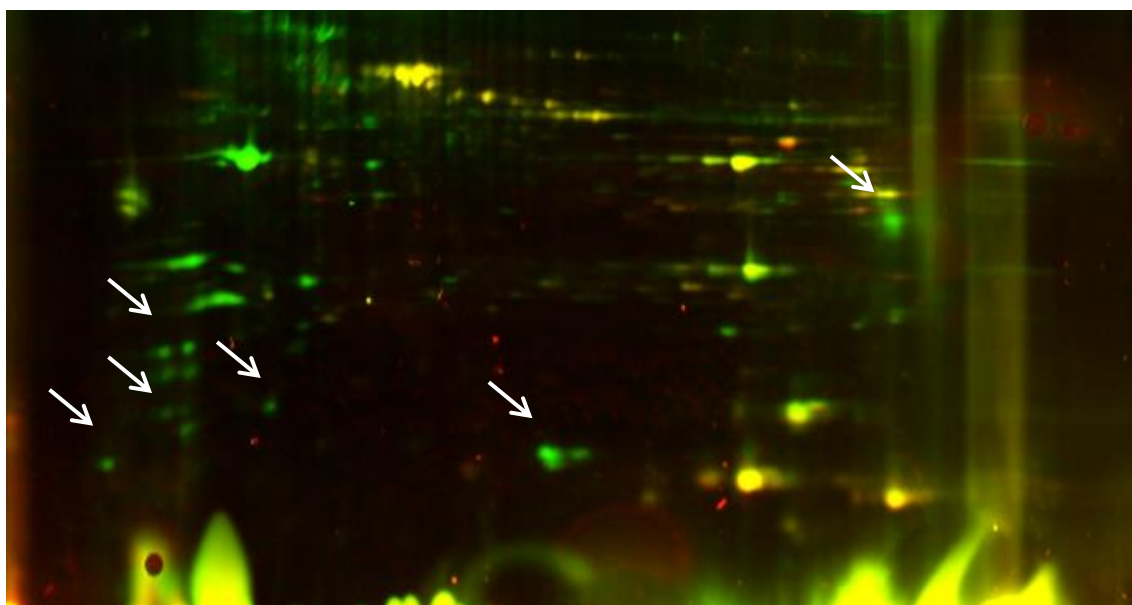


Рисунок 13. Композит электрофореграмм двумерного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na, 5 мкг белка, гель №1, Cy-5 – зеленый (контроль №1), Cy-3 – красный (пациент №1). Стрелками указаны дифференциальные белки.

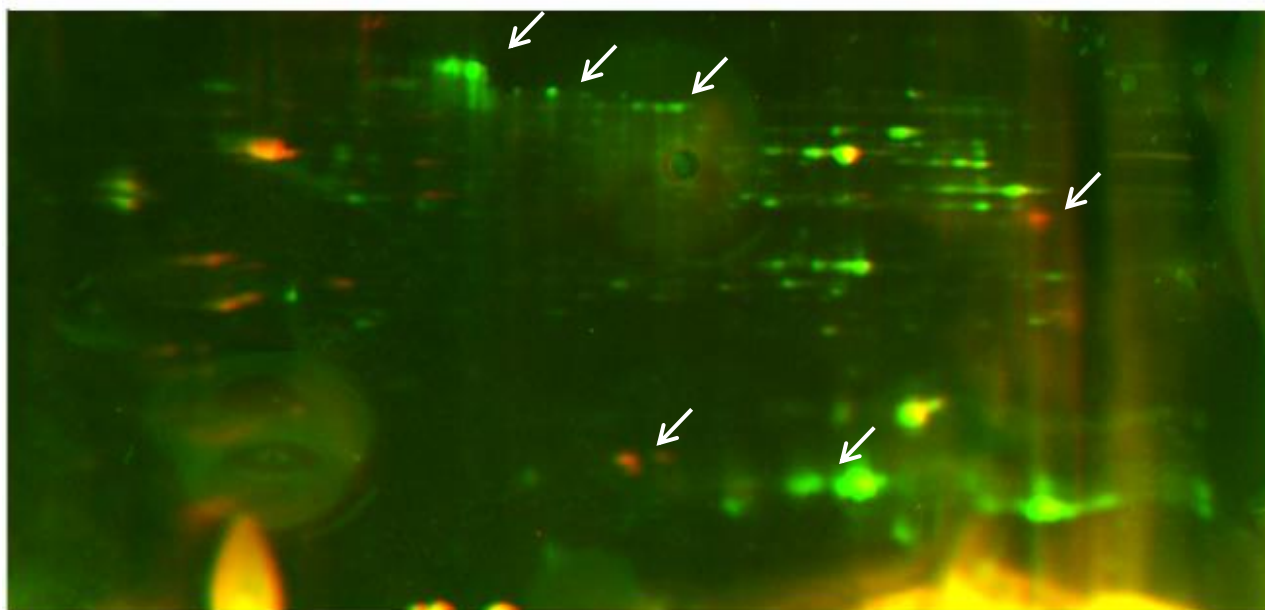


Рисунок 14. Композит электрофореграмм двумерного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na, 5 мкг белка, гель №2, Су-5 – красный (контроль №2), Су-3 – зеленый (пациент №2). Стрелками указаны дифференциальные белки.

В результате проделанной работы определены дифференциальные белки-кандидаты для дальнейшего анализа методом хромато-масс-спектрометрии.

Показано, что дистальные формы артрогрипоза могут быть вызваны мутациями различных генов. По этой причине был проведен поиск патогенных мутаций, приводящих к данному заболеванию. Для идентификации генетических вариантов, вызывающих заболевание, был использован метод экзомного секвенирования с последующим подтверждением наличия мутаций с помощью секвенирования ПЦР-фрагментов (см. рис. 14).

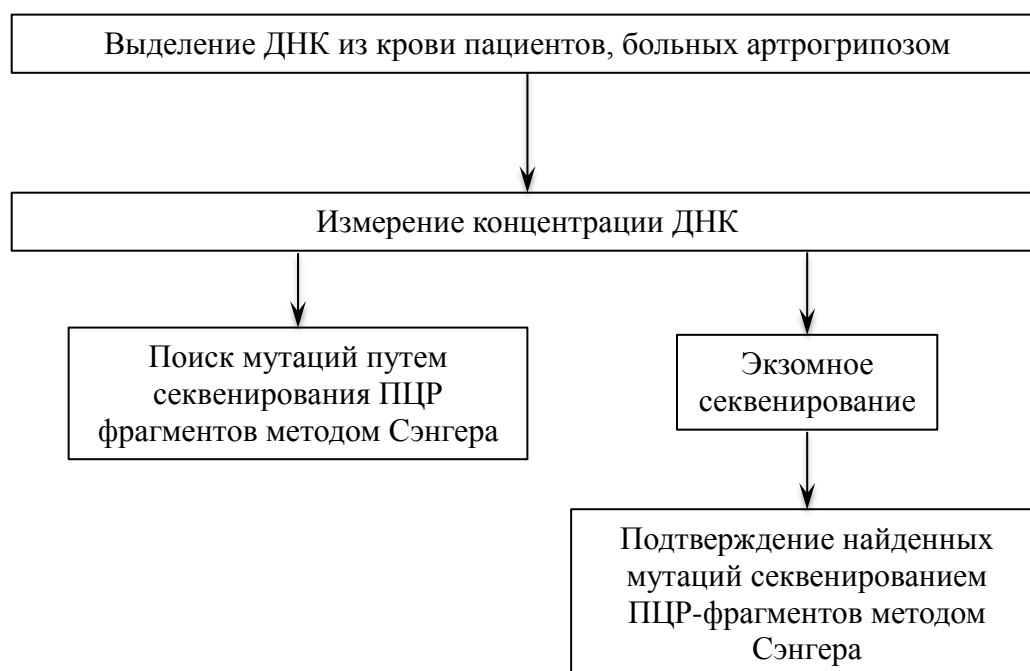


Рисунок 15. Общая схема пробоподготовки и поиска мутаций, ассоциированных с артрогрипозом

Было проведено экзомное секвенирование и биоинформатическая обработка 9 образцов геномной ДНК пациентов, больных артрогрипозом. У 5 пациентов патогенных мутаций, связанных с артрогрипозом, не обнаружено. У двух пациентов с диагнозом “дистальный артрогрипоз” (тип Шелдон-Холл, 2В) были обнаружены однонуклеотидные замены в гене *TNNT3*, кодирующем тропонин Т3 быстрого скелетного типа. У одного из пациентов с мутациями в данном гене была найдена замена С/Т (Arg63Cys) в положении 1933736, у другого - G/A (Arg63His) в положении 1933737; обе замены встречаются в литературных источниках [Daly и др., 2014; Li и др., 2018]. Данные мутации описаны в базе данных как патогенные и ассоциированы с дистальным артрогрипозом типа 2В [NM_006757.3(TNNT3):c.187C>T (p.Arg63Cys) Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI][NM_006757.3(TNNT3):c.188G>A (p.Arg63His) Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI]. Как показано на рисунках 15, а и 16, а, замены были подтверждены секвенированием ПЦР-фрагментов методом Сэнгера. Информация о праймерах

представлена в таблице 6. Такие же замены были обнаружены у больных отцов пациентов, имеющих такой же диагноз, что проиллюстрировано на рисунке 15, б и 16, б. Как видно из рисунка 16, в, у здоровой матери пациента с заменой G/A (Arg63His) мутация не была обнаружена.

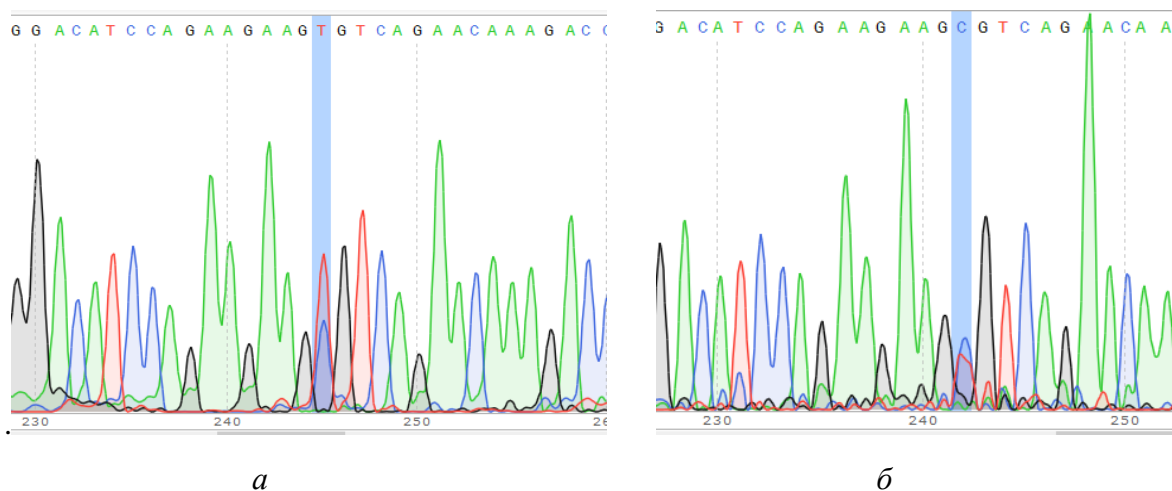


Рисунок 16. Хроматограммы сиквенсов, визуализация в программе SnapGene Viewer. Выделена замена C/T (Arg63Cys) (гетерозигота) в положении 1933736 в гене *TNNT3*.

а – пациент с диагнозом дистальный артрогрипоз (тип Шелдон-Холл, 2В)

б – отец пациента а с таким же диагнозом

Ген *TNNT3* картирован на 11 хромосоме в локусе 11p15.5. Функция данной изоформы тропонина заключается в сокращении быстрых волокон скелетных мышц: при повышении концентрации кальция происходит конформационное изменение тропонинового комплекса из трех субъединиц Т, I и С, передающееся димерам тропомиозина, расположенным вдоль нитей актина. Благодаря изменению конформации происходит взаимодействие между головкой миозина и актиновым филаментом, что приводит к сокращению мышц. Благодаря альтернативному сплайсингу имеются разные изоформы данного белка, специфичные для периода внутриутробного развития, для новорожденных и для взрослых [*TNNT3 troponin T3, fast skeletal type*].

Таблица 6

Основные характеристики подобранных олигонуклеотидов

Ген	Последовательность олигонуклеотида	Tm1, °C	Наименьшая deltaG ² , ккал/моль			Максимальное совпадение с нецелевой матрицей, %	E Value ³
			Шпилька	Гомодимер	Гетеродимер праймеров		
<i>TNNT3</i>	ATGCTGAGGACCTTATGGC	60	-0,8	-4,67	-4,54	14/19	0,0045
	GGGCTCATTCTCTGATGAGG	60	-1,32	-3,54		15/22	0,001
<i>TRPV4</i>	AGCAGGTCGTACATCTTGG	60	0.41	-3.65	-4,67	16/19	0.045
	CTCCGTCATTATCCTCAGAGC	60	0.69	-3.61		14/21	0.006
<i>TPM2</i>	GAGCCTCTCTGATCCTTATCC	60	-0,52	-4,62	-4,74	18/21	0,02
	GCTGTACACCTCTTCATATTTGC	60	0,6	-3,91		11/22	0,001

¹Tm - температура плавления;

²deltaG – свободная энергия Гиббса образования двуцепочечных структур;

³E- value – критерий E для оценки совпадений нуклеотидных последовательностей.

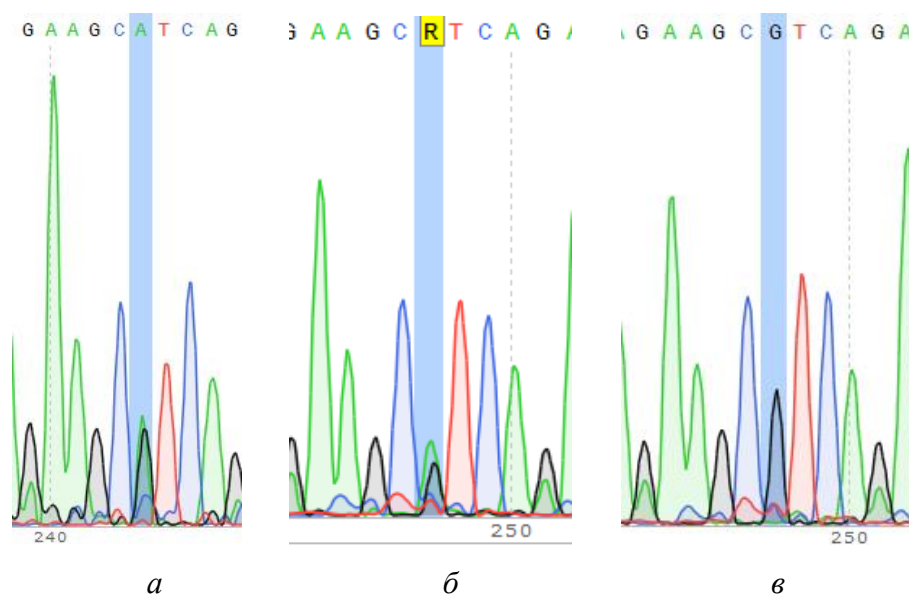


Рисунок 17. Хроматограммы сиквенсов, визуализация в программе SnapGene Viewer. Выделена замена G/A (Arg63His) в положении 1933737 в гене *TNNT3*.

а – пациент с диагнозом дистальный артрогрипоз (тип Шелдон-Холл, 2В)

б – отец пациента *а* с таким же диагнозом

в – здоровая мать пациента *а*

В ходе экзомного секвенирования у пациента с диагнозом “врожденный множественный артрогрипоз” и его отца с таким же диагнозом была выявлена мутация G/A (Arg/Trp) в гене *TRPV4* в положении 109798823. В базе данных эта мутация аннотирована как патогенная [NM_021625.4(*TRPV4*):c.943C>T (p.Arg315Trp) Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI]. Наличие мутации подтверждали секвенированием ПЦР-фрагмента методом Сэнгера (см. рис. 17, *а*). Информация о праймерах представлена в таблице 6. У здоровой матери замены не обнаружено (см. рис. 17, *б*).

Ген *TRPV4* картирован на хромосоме 12 в локусе 12q24.11 и состоит из 16 экзонов. Кодированный белок относится к семейству ТРП-каналов (ТРП, транзиторный рецепторный потенциал), представляет собой Ca²⁺-проницаемый неселективный катионный канал, который, как полагают, участвует в регуляции системного осмотического давления [TRPV4 transient receptor potential cation channel subfamily V member 4]. Этот белок экспрессируется во многих типах клеток, включая остеокласты, хондроциты и сенсорные нейроны [Nishimura и др., 2012]. Обнаружено несколько вариантов транскриптов данного гена, кодирующих разные изоформы. Мутации в данном гене ассоциированы с нервно-мышечными нарушениями [Schindler, Sumner, Hoover-Fong, 1993].

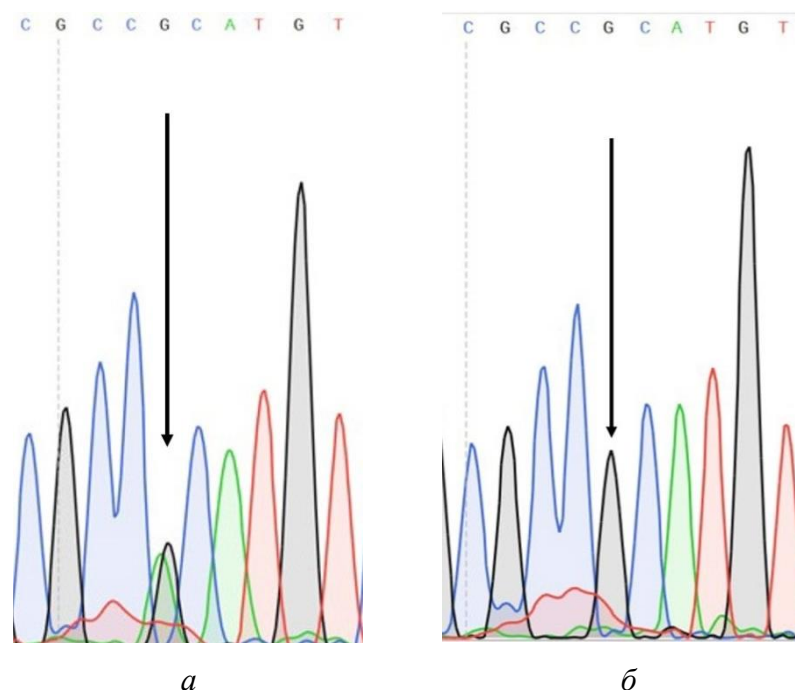


Рисунок 18. Хроматограммы сиквенсов, визуализация в программе SnapGene Viewer. Стрелкой выделена замена G/A (Arg/Trp) гена *TRPV4* в положении 109798823.

а – пациент с диагнозом врожденный множественный артрогрипоз

б – здоровая мать пациента *а*

Хотя экзомное секвенирование позволяет выявить большинство замен кодирующей части генома, что, несомненно, является необходимым на начальных этапах исследования, его недостатками являются трудоемкость, дороговизна и длительность анализа данных. В случаях, когда в литературе встречаются данные о мутациях в определенных генах, приводящих к тому или иному клиническому состоянию, есть возможность проводить поиск замен секвенированием ПЦР-фрагментов методом Сэнгера. С помощью этого метода был проведен анализ мутаций в гене *TNNT3* у 9 пациентов. По результатам данного исследования у одного пациента была обнаружена патогенная мутация G/A (Arg63His) в положении 1933737 (см. рис. 18) [NM_006757.3(TNNT3):c.188G>A (p.Arg63His) Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI].

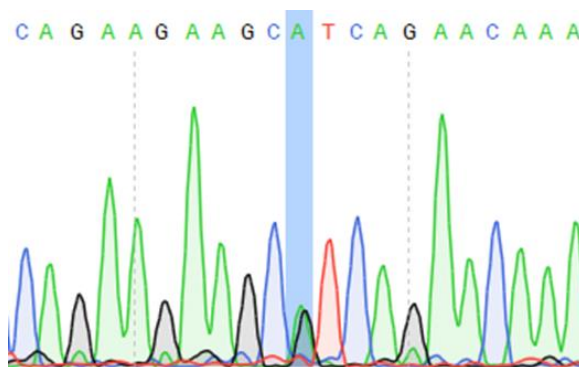


Рисунок 19. Хроматограмма сиквенса, визуализация в программе SnapGene Viewer. Выделена замена G/A (Arg63His) в положении 1933737 в гене *TNNT3*

Ежегодно описывается большое количество новых мутаций, ассоциированных с артрогрипозом. Проанализировав литературные данные за последние несколько лет, мы выявили гены, мутации в которых наиболее часто приводят к возникновению артрогрипоза. Одним из таких генов стал ген *TPM2* [Li и др., 2018; Mroczek и др., 2017]. Нами был проведен анализ мутаций в гене *TPM2* у 15 пациентов. Информация о праймерах представлена в таблице 6. У одного пациента найдена неописанная в базах данных замена с.T281C; p.Leu94Pro (см. рис. 19).

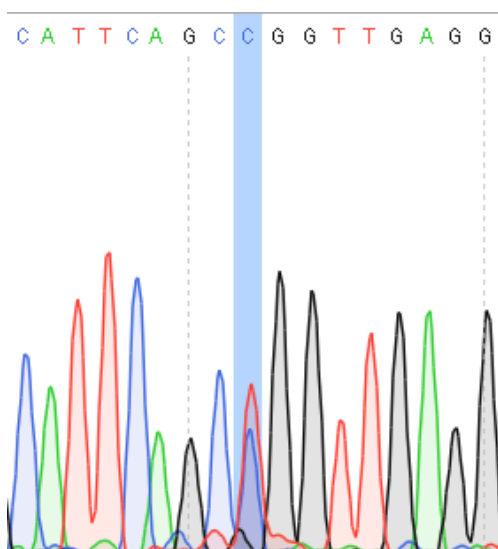


Рисунок 20. Хроматограмма сиквенса, визуализация в программе SnapGene Viewer. Выделена замена с.T281C; p.Leu94Pro в гене *TPM2*

Ген *TPM2* локализован в 9 хромосоме и кодирует бета-тропомиозин из семейства белков, связывающих актиновые филаменты, и в основном экспрессируется в медленных мышечных волокнах 1 типа [TPM2 tropomyosin 2]. Мутации в этом гене могут влиять на

экспрессию других саркомерных белков тропомиозина и вызывать различные синдромы, в том числе дистальный артрогрипоз [Tajsharghi и др., 2012].

5. Заключение

В ходе работы над выпускной квалификационной работой было проведено сравнение протеома мышечной ткани пациентов, больных артрогрипозом, и индивидуумов без артрогрипоза. С помощью метода двумерного электрофореза и 2D DIGE были выявлены дифференциальные белки, некоторые из которых были идентифицированы с помощью масс-спектрометрического анализа. Наибольший интерес среди них представляют кофилин-2 и тропонин I скелетной мускулатуры, поскольку их повреждение или отсутствие могут влиять на работу и состояние мышечной ткани в целом. Дальнейшая работа по теме подразумевает повтор экспериментов для подтверждения воспроизводимости результата, работу с новыми образцами, а также идентификацию других дифференциальных белков.

Были получены данные о мутациях в генах *TNNT3*, *TRPV4* и *TPM2*. Наибольший интерес представляет замена в последнем гене, поскольку она не описана в базах данных.

Аннотация данной замены является логичным продолжением исследования. Также планируется расширить выборку пациентов для выявления новых мутаций.

6. Выводы

1. Белковые фракции, выделенные из мышечной ткани пациентов, больных артрогрипозом, и индивидуумов без артрогрипоза (контролей) были охарактеризованы с помощью одномерного и двумерного электрофореза, а также дифференциального двумерного электрофореза. Одномерный электрофорез не выявил явных отличий белковых профилей пациентов и контролей, тогда как двумерный и 2D DIGE позволили выявить дифференциальные белки.
2. С помощью хромато-масс-спектрометрического анализа были исследованы отдельные белковые фракции, полученные с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na. Были идентифицированы 8 белковых фракций из мышечной ткани пациента, больного артрогрипозом, и 11 белковых фракций из мышечной ткани индивидуума без артрогрипоза. Было выявлено отсутствие белков кофилина-2, карбоангидразы-3, аденилаткиназы-1 и тропонина I скелетной мускулатуры в пробе пациента, больного артрогрипозом.
3. Методом экзомного секвенирования были получены данные о мутациях гена *TNNT3* двух пациентов и мутации в гене *TRPV4* двух пациентов. У 5 пациентов мутаций, связанных с артрогрипозом не обнаружено.
4. Наличие найденных мутаций было подтверждено секвенированием ПЦР-фрагментов методом Сэнгера. Присутствие мутаций было показано у больных артрогрипозом родственников пациентов и опровергнуто у здоровых. Также впервые была обнаружена неаннотированная в базах данных замена в гене *TPM2*.

7. Благодарности

Хочу выразить искреннюю благодарность своему куратору Саранцевой Светлане Владимировне за знания и опыт, приобретенные за 4 года работы, за чуткое руководство, терпение, понимание и помощь в выполнении и написании выпускной квалификационной работы бакалавра. Выражаю признательность своей научной руководительнице Соболевой Алене Вадимовне за ценные замечания и пожелания по написанию работы. Также благодарю Агранович Ольгу Евгеньевну за предоставление материала для исследования и сбор анамнеза пациентов. Хочу выразить огромную благодарность Гусеву Олегу Андреевичу за выполнение части работы, посвященной экзому секвенированию. Также выражаю благодарность сотрудникам ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ Машарскому Алексею Эльвиновичу, Волкову Кириллу Владимировичу, Бабкиной Ирине Юрьевне и Лобову Арсению Андреевичу за возможность проведения части исследования с использованием оборудования, представленного в центре, а также помощь в выполнении работы. Также выражаю глубокую благодарность коллегам из лаборатории экспериментальной и прикладной генетики НИЦ «Курчатовский Институт» - ПИЯФ за неоценимую помощь в работе.

8. Список литературы

1. Adams W. Club-foot, Its Causes, Pathology, and Treatment : Being the Essay to which the Jacksonian Prize for 1864, Given by the Royal College of Surgeons, was Awarded - Google Play. , 1873.
2. Bamshad M. и др. Distal arthrogryposis type 1: Clinical analysis of a large kindred // Am. J. Med. Genet. 1996. Т. 65. № 4. С. 282–285.
3. Bamshad M., Heest A.E. Van, Pleasure D. Arthrogryposis: A review and update // J. Bone Jt. Surg. - Ser. A. 2009. Т. 91. № SUPPL. 4. С. 40–46.
4. Bamshad M., Jorde L., Carey J. A Revised and Extended Classification of the Distal Arthrogryposes // Am. J. Med. Genet. 1996. Т. 65. С. 277–281.
5. Beckerman R.C., Buchino J.J. Arthrogryposis multiplex congenita as part of an inherited symptom complex: two case reports and a review of the literature. // Pediatrics. 1978. Т. 61. № 3. С. 417–22.
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Т. 72. № 1–2. С. 248–254.
7. Brown J.H., Cohen C. Regulation of Muscle Contraction by Tropomyosin and Troponin: How Structure Illuminates Function. , 2005. С. 121–159.
8. Dahan- Oliel N. и др. Summary of the 3rd international symposium on arthrogryposis // Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet. 2019. С. ajmg.c.31705.
9. Daly S.B. и др. Exome sequencing identifies a dominant tnnt3 mutation in a large family with distal arthrogryposis // Mol. Syndromol. 2014. Т. 5. № 5. С. 218–228.
10. Darin N. и др. Multiple congenital contractures: Birth prevalence, etiology, and outcome // J. Pediatr. 2002. Т. 140. № 1. С. 61–67.
11. Drachman D.B., Coulombre A.J. EXPERIMENTAL CLUBFOOT AND ARTHROGRYPOSIS MULTIPLEX CONGENITA - PDF Free Download // Lancet. 1962. Т. 15.
12. Gibson D.A., Carroll N. CONGENITAL PSEUDARTHROSIS OF THE CLAVICLE // J. Bone Joint Surg. Br. 1970. Т. 52-B. № 4. С. 629–643.

13. Goncalves L.F. и др. Opinion Newer imaging modalities in the prenatal diagnosis of skeletal dysplasias // Wiley Intersci. 2004.
14. Gut I.G. New sequencing technologies // Clin. Transl. Oncol. 2013. T. 15. № 11. С. 879–881.
15. Hahn G. Arthrogryposis. Pediatric review and habilitative aspects. // Clin. Orthop. Relat. Res. 1985. № 194. С. 104–14.
16. Hall J.G. и др. Summary of the 2nd international symposium on arthrogryposis, St. Petersburg, Russia, September 17-19, 2014 // Am. J. Med. Genet. Part A. 2015. T. 167. № 6. С. 1193–1195.
17. Hall J.G., Kimber E., Bosse H.J.P. van. Genetics and Classifications // J. Pediatr. Orthop. 2017. T. 37. С. S4–S8.
18. Issaq H.J., Veenstra T.D. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives // Biotechniques. 2008. T. 44. № 5. С. 697–700.
19. Kowalczyk B., Feluś J. Arthrogryposis: An update on clinical aspects, etiology, and treatment strategies // Arch. Med. Sci. 2016. T. 12. № 1. С. 10–24.
20. Lee H.S. Amyoplasia congenita of the lower extremity: report in a premature baby. // Yonsei Med. J. 2005. T. 46. № 4. С. 567–70.
21. Lester R. и др. Background to the 2nd International Symposium on Arthrogryposis // J. Pediatr. Orthop. 2017. T. 37. С. S2–S3.
22. Li S. и др. Novel mutations in TPM2 and PIEZO2 are responsible for distal arthrogryposis (DA) 2B and mild DA in two Chinese families // BMC Med. Genet. 2018. T. 19. № 1. С. 179.
23. LIPTON E.L., MORGENSTERN S.H. ARTHROGRYPOSIS MULTIPLEX CONGENITA IN IDENTICAL TWINS // Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 1955. T. 89. № 2. С. 233.
24. Lowry R.B. и др. Prevalence of multiple congenital contractures including arthrogryposis multiplex congenita in Alberta, Canada, and a strategy for classification and coding // Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol. 2010. T. 88. № 12. С. 1057–1061.
25. Magnus F. Ein fall von multiplen congenitalen contracturen mit muskelddefecten // Ztschr f Orthop Chir Stuttgart. 1903.

26. Mathews T.J., Macdorman M.F., Thoma M.E. Infant Mortality Statistics From the 2013 Period Linked Birth/Infant Death Data Set. , 2013.
27. McGough A. и др. Cofilin Changes the Twist of F-Actin: Implications for Actin Filament Dynamics and Cellular Function // J. Cell Biol. 1997. Т. 138. № 4. С. 771–781.
28. Mennen U. и др. Arthrogryposis Multiplex Congenita // J. Hand Surg. Br. Eur. Vol. 2005. Т. 30. № 5. С. 468–474.
29. Middleton D.S. STUDIES ON PRENATAL LESIONS OF STRIATED MUSCLE AS A CAUSE OF CONGENITAL DEFORMITY // Edinb. Med. J. 1934.
30. Mroczek M. и др. A novel TPM2 gene splice-site mutation causes severe congenital myopathy with arthrogryposis and dysmorphic features // J. Appl. Genet. 2017. Т. 58. № 2. С. 199–203.
31. Nishimura G. и др. TRPV4-associated skeletal dysplasias // Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet. 2012. Т. 160C. № 3. С. 190–204.
32. Parilla B. V. и др. Antenatal Detection of Skeletal Dysplasias // J. Ultrasound Med. 2003. Т. 22. № 3. С. 255–258.
33. Pasma A., Wildervanck L.S. Heredity occurrence of congenital rigidity of the elbows and knees (Congenital multiple „Pseudarthrogryposis“) // Arch. chir. neerl. 1956. С. 43–56.
34. Pous J.G. [Arthrogryposis in childhood. Arthrogryposis multiplex congenita]. // Chir. Pediatr. 1981. Т. 22. № 5. С. 289–363.
35. Rabilloud T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses // Electrophoresis. 1996. Т. 17. № 5. С. 813–829.
36. Robinson P. и др. Mutations in fast skeletal troponin I, troponin T, and β -tropomyosin that cause distal arthrogryposis all increase contractile function // FASEB J. 2007. Т. 21. № 3. С. 896–905.
37. ROSSI E., CAFLISCH A. The pterygium syndrome; status Bonnevie-Ullrich, dystrophia brevicollis congenita, Turner's syndrome and congenital arthromyodysplasia // Helv Paediatr Acta. 1951. Т. 6(2).
38. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. 1977. Т. 74. № 12. С. 5463–5467.

39. Schantz A. Ein fall von multiplen kongenitalen kontrakturen // Z Orthop Chir. 1898. T. 5.
40. Schindler A., Sumner C., Hoover-Fong J.E. TRPV4-Associated Disorders. University of Washington, Seattle, 1993.
41. Sells J.M., Jaffe K.M., Hall J.G. Amyoplasia, the Most Common Type of Arthrogryposis: The Potential for Good Outcome // Pediatrics. 1996. T. 97. № 2.
42. Sheldon W. Amyoplasia Congenita: (Multiple congenital articular rigidity: Arthrogryposis multiplex congenita) // Arch. Dis. Child. 1932. T. 7. № 39. C. 117–136.
43. SHTURM V.A. CARVED BONE GRAFTS IN THE TREATMENT OF PSEUDARTHROSES AND DEFECTS OF LONG BONES // Ortop. Travmatol. Protez. 1964. T. 25. C. 51–2.
44. Skaria P., Dahl A., Ahmed A. Arthrogryposis multiplex congenita in utero: radiologic and pathologic findings // J. Matern. Neonatal Med. 2019. T. 32. № 3. C. 502–511.
45. STEINDLER A. Arthrogryposis. // J. Int. Coll. Surg. 1949. T. 12. № 1. C. 21–5.
46. Stern W.G. ARTHROGRYPOSIS MULTIPLEX CONGENITA // JAMA J. Am. Med. Assoc. 1923. T. 81. № 18. C. 1507.
47. Swinyard C.A., Mayer V. Multiple Congenital Contractures // JAMA. 1963. T. 183. № 1.
48. Tajsharghi H. и др. Myopathies associated with β -tropomyosin mutations // Neuromuscul. Disord. 2012. T. 22. № 11. C. 923–933.
49. U. K. Laemmli. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. T. 227. C. 680–685.
50. Ünlü M., Morgan M.E., Minden J.S. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts // Electrophoresis. 1997. T. 18. № 11. C. 2071–2077.
51. Агранович О.Е., Баиндурашвили А.Г., Петрова Е.В. Консервативное лечение деформаций верхних и нижних конечностей у детей раннего возраста с артрогрипозом // 2012. C. 2–7.
52. Альбамасова Е.В., Лузина Е.В. Врожденные деформации опорно-двигательного аппарата и причины их происхождения.Pdf // 2006. 1976. C. 179.
53. Ассоциация травматологов-ортопедов России. Диагностика и лечение врожденного

множественного артрогрипоза, Клинические рекомендации. , 2013.

54. Баиндурашвили А.Г. и др. Современные тенденции лечения деформаций верхних и нижних конечностей у детей с артрогрипозом первого года жизни // Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. 2014. № 2002. С. 3–13.
55. Баиндурашвили А.Г. и др. Региональная статистика врожденных аномалий (пороков развития) костно-мышечной системы у детей г. Санкт-Петербурга // Журнал клинической и экспериментальной ортопедии им. Г.А. Илизарова. 2018. Т. 24. № 2. С. 189–196.
56. Бут-Гусаим И.А. Диагностика и лечение контрактур и деформаций конечностей у детей с артрогрипозом // 2005.
57. Малахов О.Л. и др. КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ВРОЖДЕННОГО АРТРОГРИПОЗА У ДЕТЕЙ. Москва: Медицина, 2003. 79–85 С.
58. Петрова Е.В. Ортопедо-хирургическое лечение детей младшего возраста с артрогрипозом // 2008.
59. Розовская Л.Е., Тер-Егiazаров Г.. Артрогрипоз. Медицина, 1973. 142 С.
60. Стыгар А.М., Храмченко Н.В. Ранняя ультразвуковая диагностика артрогрипоза у плода // Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2009. Т. 6. № 910. С. 101–106.
61. Types of birth defects | NICHD [Электронный ресурс]. URL: <https://www.nichd.nih.gov/health/topics/birthdefects/conditioninfo/types> (дата обращения: 26.05.2019).
62. Congenital anomalies [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies> (дата обращения: 26.04.2019).
63. Arthrogryposis - ClinVar - NCBI [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?term=arthrogryposis&cmd=correctspelling> (дата обращения: 01.04.2019).
64. Артрогрипоз, лечение артрогрипоза. Ортопедохирургическое лечение артрогрпоза. [Электронный ресурс]. URL: http://www.turner.ru/sys_artogrip.html (дата обращения: 02.02.2019).
65. Клиника артрогрипоза Институт им. Г.И.Турнера Минздрава РФ [Электронный ресурс]. URL: <https://www.rosturner.ru/k110.htm> (дата обращения: 02.03.2019).

66. Quick-DNA™ Midiprep Plus Kit [Электронный ресурс]. URL: www.zymoresearch.com (дата обращения: 29.04.2019).
67. Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit Catalog Nos. D4001T, D4001, D4002, D4007 & D4008 [Электронный ресурс]. URL: https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4001t_d4001_d4002_d4007_d4008_zymoclean_gel_dna_recovery_kit.pdf (дата обращения: 29.04.2019).
68. NM_006757.3(TNNT3):c.187C>T (p.Arg63Cys) Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/31874/> (дата обращения: 31.05.2019).
69. NM_006757.3(TNNT3):c.188G>A (p.Arg63His) Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/8913/> (дата обращения: 31.05.2019).
70. TNNT3 troponin T3, fast skeletal type [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7140> (дата обращения: 03.05.2019).
71. NM_021625.4(TRPV4):c.943C>T (p.Arg315Trp) Simple - Variation Report - ClinVar - NCBI [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20037588>.
72. TRPV4 transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59341> (дата обращения: 03.03.2019).
73. TPM2 tropomyosin 2 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7169> (дата обращения: 03.02.2019).

9. Приложение

Таблица 7

Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа триптических гидролизатов белковых фракций из мышц индивидуума без артрогрипоза (контроля) №1

Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифици рованных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
1	79	31	458.69	67.1	42392.6	5.23	P68133	α-скелетный актин		
	#	Аминокислотная последовательность					Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH+ (Да)	pI пептида
	1	(K)AGFAGDDAPRAVFPSIVGRPR(H)					17.82	1078.5726	2156.1359	9.56
	2	(R)AVFPSIVGRPR(H)					15.90	599.8582	1198.7055	12.00
	3	(R)CPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMK(C)					22.22	1594.7415	3188.4737	4.75
	4	(R)DIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLEK(S)					24.33	788.1348	3149.5017	4.36
	5	(R)DLTDYLMK(I)					18.03	499.7473	998.4863	4.21
	6	(K)DLYANNVMSGGTTMYPGIADR(M)					18.17	1123.5162	2246.0216	4.21
	7	(K)EITALAPSTMK(I)					14.43	581.3138	1161.6184	6.10
	8	(K)EITALAPSTMKIK(I)					15.67	701.9041	1402.7974	8.69
	9	(K)EKLCYVALDFENEMATAASSSSLEK(S)					22.12	1397.1530	2793.2957	4.25
	10	(R)FRCPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMK(C)					22.45	873.6692	3491.6432	5.50
	11	(R)GILTLK(Y)					15.03	322.7215	644.4341	8.75
	12	(R)GYSFVTTAER(E)					14.28	565.7785	1130.5477	6.00
	13	(R)HQGVMVGMGQK(D)					11.00	586.2904	1171.5711	8.76
	14	(R)HQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSK(R)					12.98	1176.0430	2351.0755	5.38
	15	(R)HQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKR(G)					12.52	627.5525	2507.1766	6.75
	16	(K)IIAPPER(K)					10.87	398.2418	795.4723	6.00
	17	(K)IIAPPERK(Y)					9.45	462.2888	923.5673	8.75
	18	(K)IKIIAPPER(K)					13.25	518.8308	1036.6513	8.75

	19	(K)IKIIPPERK(Y)					11.95	582.8785	1164.7463	9.99
	20	(K)IWHHTFYNELR(V)					15.32	758.3801	1515.7492	6.92
	21	(R)KDLYANNVMSGGTTMYPGIADR(M)					17.02	1187.5633	2374.1166	5.96
	22	(K)LCYVALDFENEMATAASSSSLEK(S)					22.07	1268.5853	2536.1582	4.00
	23	(R)LDLAGR(D)					10.63	322.6919	644.3726	5.84
	24	(R)LDLAGRDLTDYLMK(I)					20.03	812.4263	1623.8411	4.43
	25	(R)MQKEITALAPSTMK(I)					14.55	774.9121	1548.8124	8.35
	26	(R)MQKEITALAPSTMKIK(I)					15.43	895.5012	1789.9914	9.70
	27	(K)RGILTLK(Y)					13.70	400.7723	800.5352	11.00
	28	(K)SYELPDGQVITIGNER(F)					18.60	895.9511	1790.8919	4.14
	29	(K)SYELPDGQVITIGNERFR(C)					18.97	1047.5355	2094.0614	4.68
	30	(R)TTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIMR(L					20.33	799.9118	3196.6096	5.20
	31	(R)VAPEEHPTLLTEAPLNPK(A)					16.53	978.5294	1956.0437	4.75
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированн ых пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
2	70	29	300.11	53.2	71362.3	5.92	P02768	Сывороточный альбумин		
	#	Аминокислотная последовательность					Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
	1	(K)ADDKETCFAEEGKK(L)					9.28	814.3683	1627.7268	4.51
	2	(R)AFKAWAVAR(L)					14.63	510.2938	1019.5785	11.00
	3	(K)ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK(L)					26.33	1245.6478	2490.2850	5.32
	4	(K)ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAK(T)					27.38	1207.6347	3620.8822	4.83
	5	(K)AVMDDFAAFVEK(C)					20.57	671.8238	1342.6348	4.03
	6	(K)AVMDDFAAFVEKCK(A)					20.10	895.8999	1790.7910	4.56
	7	(K)CASLQKFGER(A)					11.73	598.2992	1195.5888	8.75
	8	(K)CCAAADPHECYAK(V)					9.13	776.8027	1552.5977	5.32
	9	(R)DAHKSEVAHR(F)					2.85	575.2918	1149.5759	6.92
	10	(K)ECCEKPLLEK(S)					10.87	653.3133	1305.6177	4.79
	11	(R)FKDLGEENFK(A)					13.60	613.8076	1226.6052	4.68

	12	(K)KQTALVELVK(H)	15.03	564.8553	1128.6987	8.59				
	13	(K)KVPQVSTPTLVEVSR(N)	15.62	820.4747	1639.9377	8.75				
	14	(R)LAKTYETTLEK(C)	11.58	648.8599	1296.7046	6.14				
	15	(K)LDELRLDEGK(A)	9.32	537.7759	1074.5426	4.32				
	16	(R)LKCSLQKFGER(A)	12.53	718.8887	1436.7678	9.99				
	17	(K)LKECCEKPLLEK(S)	11.37	773.9046	1546.7968	6.23				
	18	(K)LVAASQAALGL(-)	17.42	507.3043	1013.5990	5.52				
	19	(K)LVNEVTEFAK(T)	15.32	575.3124	1149.6150	4.53				
	20	(K)LVTDLTK(V)	11.75	395.2397	789.4716	5.84				
	21	(K)QEPERNECFLQHKDDNPNLPR(L)	13.03	879.4167	2636.2270	4.90				
	22	(K)QNCLEFQLGEYKFQNALLVR(Y)	22.15	867.1075	2599.2973	4.79				
	23	(K)KQTALVELVK(H)	16.47	500.8066	1000.6037	6.00				
	24	(R)RHPDYSVLLLR(L)	19.02	489.9550	1467.8431	8.75				
	25	(K)SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK(D)	22.93	992.1230	2974.3445	3.95				
	26	(K)VFDEFKPLVEEPQNLIK(Q)	20.62	1023.0532	2045.0954	4.41				
	27	(K)VHTECCHGDLLECADDRADLAK(Y)	14.23	862.3801	2585.1177	4.51				
	28	(K)YICENQDSISSK(L)	10.85	722.3245	1443.6420	4.37				
	29	(R)YTKKVPQVSTPTLVEVSR(N)	14.95	1016.5758	2032.1437	9.70				
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированны х пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
3	96	35	408.10	57.1	71362.3	5.92	P02768	Сывороточный альбумин		
	#	Аминокислотная последовательность				Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида	
	1	(K)AACLLPK(L)				12.70	386.7255	772.4386	8.80	
	2	(K)AEFAEVSK(L)				10.90	440.7241	880.4411	4.53	
	3	(K)AEFAEVSKLVTDLTK(V)				23.70	825.9524	1650.8949	4.68	
	4	(R)AFKAWAVAR(L)				20.22	510.2938	1019.5785	11.00	
	5	(K)ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK(L)				27.18	1245.6489	2490.2850	5.32	
	6	(K)ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAK(T)				28.28	1207.6336	3620.8822	4.83	
	7	(K)AVMDDFAAFVEK(C)				21.32	671.8225	1342.6348	4.03	
	8	(K)AVMDDFAAFVEKCCK(A)				21.80	895.9004	1790.7910	4.56	
	9	(K)CASLQKFGER(A)				11.78	598.2982	1195.5888	8.75	

	10	(K)CCAAADPHECYAK(V)	9.17	776.8044	1552.5977	5.32
	11	(K)CCTESLVNR(R)	10.75	569.7539	1138.4980	6.00
	12	(K)DVFLGMFLYEYAR(R)	26.23	812.4002	1623.7876	4.37
	13	(K)ECCEKPLLEK(S)	10.88	653.3152	1305.6177	4.79
	14	(R)FKDLGEENFK(A)	13.67	613.8092	1226.6052	4.68
	15	(K)KVPQVSTPTLVEVSR(N)	16.33	820.4729	1639.9377	8.75
	16	(R)LAKTYETTLEK(C)	11.60	648.8583	1296.7046	6.14
	17	(K)LDELRDEGK(A)	9.28	537.7766	1074.5426	4.32
	18	(K)LDELRDEGKASSAK(Q)	9.30	759.8939	1518.7758	4.79
	19	(R)LKCASLQKFGER(A)	20.42	718.8858	1436.7678	9.99
	20	(K)LKECCEKPLLEK(S)	11.33	773.9036	1546.7968	6.23
	21	(K)LVAASQAALGL(-)	17.43	507.3038	1013.5990	5.52
	22	(K)LVNEVTEFAK(T)	15.47	575.3125	1149.6150	4.53
	23	(K)LVTDLTK(V)	11.73	395.2407	789.4716	5.84
	24	(K)QEPERNECFLQHKDDNPMLPR(L)	21.20	659.8147	2636.2270	4.90
	25	(K)QNCSELFQLGEYKFQNALLVR(Y)	23.47	1300.1549	2599.2973	4.79
	26	(K)QTALVELVK(H)	16.67	500.8068	1000.6037	6.00
	27	(K)QTALVELVKHKPK(A)	22.13	745.9588	1490.9053	9.70
	28	(R)RHPDYSVVLRL(L)	23.58	734.4272	1467.8431	8.75
	29	(R)RPCFSALEVDETYVPK(E)	20.60	955.9715	1910.9317	4.68
	30	(K)SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK(D)	23.88	1487.6782	2974.3445	3.95
	31	(K)TPVSDRVTK(C)	6.58	501.7817	1002.5578	8.41
	32	(K)VFDEFKPLVEEPQNLIK(Q)	22.30	1023.0544	2045.0954	4.41
	33	(K)VPQVSTPTLVEVSR(N)	16.38	756.4256	1511.8428	5.97
	34	(K)YICENQDSISSK(L)	10.87	722.3282	1443.6420	4.37
	35	(R)YTKKVPQVSTPTLVEVSR(N)	20.57	1016.5778	2032.1437	9.70

Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
4	22	9	102.24	62	18850.4	7.78	Q9Y281	Кофилин-2		
#	Аминокислотная последовательность					Время удерживания (мин)		m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида

1	(K)AVLFCLSDDKR(Q)	16.53	662.3423	1323.6725	6.00
2	(K)ESKKEDLVFIFWAPESAPLK(S)	22.97	584.3180	2334.2380	4.87
3	(K)KEDLVFIFWAPESAPLK(S)	23.93	995.5398	1990.0684	4.68
4	(K)LGGNVVVSLEGKPL(-)	18.53	691.4094	1381.8049	6.00
5	(K)LLPLNDCR(Y)	13.80	500.7666	1000.5244	5.84
6	(K)MIYASSKDAIK(K)	11.78	613.8266	1226.6449	8.26
7	(R)QIIVEEAK(Q)	11.45	465.2686	929.5302	4.53
8	(K)QILVGDIGDTVEDPYTSFVK(L)	20.93	1098.5598	2196.1071	3.84
9	(R)YALYDATYETK(E)	14.93	669.3174	1337.6260	4.37

Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка			
5	47	26	352.54	91.9	29842.1	6.87	P07451	Карбоангидраза-3			
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида	
1	(R)DGIIVIGIFLK(I)						24.03	573.3515	1145.6929	5.84	
2	(K)DIRHDPSLQPWSVSYDGGS AK(T)						16.40	1158.0594	2315.1051	5.30	
3	(R)DYWTYQGSFTTPPCEECIVWLLK(E)						27.10	1503.7066	3006.4052	4.14	
4	(K)EAPFTKFDPSCLFPACR(D)						20.85	1021.9803	2042.9463	6.17	
5	(K)EPMTVSSDQMAK(L)						11.45	662.3023	1323.5919	4.37	
6	(K)EWGYASHNGPDHWHELF PNAK(G)						17.67	1246.5627	2492.1167	5.75	
7	(K)FDPSCLFPACR(D)						19.17	685.3068	1369.6028	5.84	
8	(R)GGPLPGPYR(L)						12.92	457.2500	913.4890	8.75	
9	(R)GGPLPGPYRLR(Q)						14.62	591.8425	1182.6742	10.84	
10	(R)HDPSLQPWSVSYDGGS AK(T)						16.07	965.9524	1930.8930	5.21	
11	(K)IGHENG EFQIFLDALDK(I)						23.17	973.4905	1945.9654	4.31	
12	(K)IGHENG EFQIFLDALDKIK(T)						25.28	1094.0749	2187.1444	4.75	
13	(R)QFHLHWGSSDDHGSEHTVDGVK(Y)						14.45	1238.0585	2475.1072	5.58	
14	(R)SLLSSAENEPVPLVSNWRPPQPINNR(V)						20.87	1506.2920	3011.5697	5.87	
15	(R)SLLSSAENEPVPLVSNWRPPQPINNRVVR(A)						20.98	842.2110	3365.8077	9.23	
16	(R)SLLSSAENEPVPLVSNWRPPQPINNRVVRASF K(-)						21.88	950.5174	3799.0402	10.74	
17	(K)TILNNGK(T)						7.50	380.2241	759.4359	8.41	
18	(K)TILNNGKTCR(V)						8.48	588.8134	1176.6154	11.00	

19	(R)VVFDDTYDR(S)	13.62	565.2634	1129.5160	3.93
20	(R)VVFDDTYDRSMLR(G)	16.27	808.8930	1616.7737	4.43
21	(R)VVFDDTYDRSMLRGGPLPGPYR(L)	18.37	628.5693	2511.2449	6.01
22	(R)VVRASFK(-)	8.83	403.7492	806.4883	11.00
23	(K)YAAELHLVHWNPK(Y)	16.52	789.4180	1577.8223	6.92
24	(K)YAAELHLVHWNPKYNTFK(E)	17.63	1116.0753	2231.1396	8.44
25	(K)YNTFKEALK(Q)	12.65	557.3011	1113.5939	8.50
26	(K)YNTFKEALKQR(D)	12.27	699.3817	1397.7536	9.70

Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
6	29	16	214.93	74.2	21748.6	8.92	P00568	Аденилаткиназа-1		
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)ATEPVIAFYEK(R)						16.57	712.3856	1423.7580	6.19
2	(R)EVQQGEEFER(R)						10.67	625.7867	1250.5648	4.09
3	(R)EVQQGEEFERR(I)						10.22	703.8386	1406.6659	4.49
4	(K)GFLIDGYPR(E)						17.67	519.2746	1037.5415	5.83
5	(K)GQLVPLETVLDMLR(D)						27.53	792.4476	1583.8825	4.37
6	(K)GQLVPLETVLDMLRDAMVAK(V)						30.27	733.7353	2199.1876	4.56
7	(K)GQLVPLETVLDMLRDAMVAKVNTSK(G)						28.53	910.1656	2728.4736	6.12
8	(R)IGQPTLLLYVDAGPETMTQR(L)						21.47	1102.0775	2203.1427	4.37
9	(K)IIFVVGGPGSGK(G)						16.82	565.8330	1130.6568	8.75
10	(K)IIFVVGGPGSGKGTQCEK(I)						15.63	917.4811	1833.9527	8.59
11	(K)IVQKYGYTHLSTGDLLR(S)						16.32	982.5350	1964.0600	8.50
12	(R)KVNAEGSVDSVFSQVCTHLDALK(-)						21.25	1252.6283	2504.2450	5.38
13	(K)RLETYYK(A)						10.67	486.7623	972.5149	8.50
14	(K)TKIIFVVGGPGSGK(G)						16.12	680.4044	1359.7995	10.00
15	(K)VNAEGSVDSVFSQVCTHLDALK(-)						22.25	1188.5804	2376.1500	4.54
16	(K)YGYTHLSTGDLLR(S)						16.65	748.3822	1495.7540	6.74
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search	Покрывтие%	MW белка	pI белка	ID белка	Название белка		

			Score		(Да)			
6	34	15	194.24	46.7	21509.3	9.13	P48788	Тропонин I скелетной мускулатуры
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да) MH ⁺ (Да) pI пептида
1	(R)DLRDVG DWR(K)						15.30	566.2818 1131.5541 4.43
2	(R)DLRDVG DWRK(N)						13.93	630.3292 1259.6491 6.04
3	(R)DVGDWRK(N)						10.30	438.2234 875.4370 5.96
4	(R)DVGDWRKNIEEK(S)						13.60	744.8782 1488.7441 4.79
5	(K)ELED MNQK LFDLR(G)						18.57	825.9138 1650.8156 4.32
6	(K)IDAA EEEK YDMEVR(V)						13.63	849.3909 1697.7687 4.08
7	(K)LFDLR(G)						16.18	332.1956 663.3824 5.84
8	(R)MSAD AMLK(A)						13.23	433.7095 866.4110 5.59
9	(R)MSAD AMLK ALLGSK(H)						22.80	479.2620 1435.7647 8.35
10	(K)NIEEK SGMEGR(K)						8.82	625.2962 1249.5841 4.79
11	(K)SVMLQIA ATELEK(E)						19.80	716.8915 1432.7716 4.53
12	(K)SVMLQIA ATELEKEESR(R)						20.03	967.5007 1933.9899 4.49
13	(K)SVMLQIA ATELEKEESRR(E)						19.40	523.2811 2090.0910 4.94
14	(K)TSKELED MNQK(L)						9.55	661.8177 1322.6257 4.68
15	(R)VRMSAD AMLK(A)						13.53	561.2949 1121.5806 8.72
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтне%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка
7	3	2	14.64	21.8	15314.3	8.90	P69905	Альфа-субъединица гемоглобина
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да) MH ⁺ (Да) pI пептида
1	(K)TYFPHFDLSHGSAQVK(G)						17.13	917.4506 1833.8919 6.61
2	(K)VGAHAGEYGAELER(M)						12.65	510.5823 1529.7343 4.75
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтне%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка
8	20	7	55.39	29.8	17240.5	7.14	P02144	Миоглобин

#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)ALELFRK(D)						14.95	438.7710	876.5302	8.79
2	(K)ALELFRKDMASNYK(E)						16.05	843.4390	1685.8680	8.54
3	(K)GHPETLEKFDKFK(H)						13.60	525.9422	1575.8166	6.76
4	(K)HGATVLTALGGILK(K)						21.27	675.9093	1350.8104	8.76
5	(K)HGATVLTALGGILKK(K)						19.82	739.9579	1478.9053	10.00
6	(K)KHGATVLTALGGILK(K)						19.82	739.9579	1478.9053	10.00
7	(R)LFKGHPETLEK(F)						11.08	649.8590	1298.7103	6.76
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
9	58	25	362.71	85	17240.5	7.14	P02144	Миоглобин		
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)ALELFR(K)						17.15	374.7226	748.4352	6.05
2	(K)ALELFRK(D)						14.97	438.7703	876.5302	8.79
3	(K)ASEDLKKHGATVLTALGGILK(K)						23.60	1061.6175	2122.2230	8.55
4	(K)DMASNYK(E)						8.20	414.6826	828.3556	5.83
5	(K)DMASNYKELGFQG(-)						16.82	730.3319	1459.6522	4.37
6	(K)FDKFK(H)						8.83	342.6900	684.3715	8.59
7	(K)GHHEAEIKPLAQSHATK(H)						9.30	927.4866	1853.9617	7.03
8	(K)GHPETLEK(F)						4.02	455.7358	910.4629	5.40
9	(K)GHPETLEKFDKFK(H)						13.92	788.4138	1575.8166	6.76
10	(K)HGATVLTALGGILK(K)						21.40	675.9126	1350.8104	8.76
11	(K)HGATVLTALGGILKK(K)						19.95	739.9594	1478.9053	10.00
12	(K)HLKSEDEM(K)						3.57	558.7717	1116.5354	5.44
13	(K)HLKSEDEMKASEDLK(K)						10.92	880.4311	1759.8531	4.90
14	(K)HPGDFGADAQGAMNK(A)						11.98	758.3369	1515.6645	5.21
15	(R)KDMASNYK(E)						4.33	478.7297	956.4506	8.50
16	(R)KDMASNYKELGFQG(-)						15.22	794.3795	1587.7472	6.07
17	(K)KGHHEAEIKPLAQSHATK(H)						8.90	991.5341	1982.0566	8.52

18	(K)KHGATVLTALGGILK(K)					22.32	739.9583	1478.9053	10.00
19	(K)KHGATVLTALGGILKK(K)					23.38	804.0063	1607.0003	10.30
20	(K)KKGHHEAEIKPLAQSHATK(H)					12.15	704.0566	2110.1516	9.53
21	(R)LFKGHPETLEK(F)					11.13	649.8599	1298.7103	6.76
22	(R)LFKGHPETLEKFDK(F)					13.87	844.9551	1688.9006	6.76
23	(K)SEDEMKASEDLKK(H)					9.97	755.3611	1509.7101	4.51
24	(K)VEADIPGHGQEVLR(L)					15.08	816.9410	1632.8704	4.65
25	(K)YLEFISECIQVLQSK(H)					26.72	985.5214	1970.0303	4.53
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка	
11	44	14	256.23	89.7	16112.2	6.75	P68871	Бета-субъединица гемоглобина	
#	Аминокислотная последовательность					Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)EFTPPVQAAYQK(V)					14.47	689.8549	1378.7001	6.10
2	(R)FFESFGDLSTPDVAVMGPNK(V)					20.48	1029.9808	2058.9477	4.03
3	(K)GTFATLSELHCDKLHVDPENFR(L)					18.05	862.7543	2586.2405	5.31
4	(K)KVLGAFSDGLAHLNLK(G)					18.98	899.5013	1797.9858	6.75
5	(R)LLGNVLVCVLAHHFGK(E)					23.57	445.0054	1776.9942	8.76
6	(R)LLGNVLVCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQK(V)					24.03	1046.2339	3136.6765	8.51
7	(R)LLVVYPWTQR(F)					20.10	637.8690	1274.7256	8.75
8	(R)LLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDVAVMGPNK(V)					26.63	1105.5587	3314.6554	4.56
9	(K)SAVTALWGK(V)					16.80	466.7644	932.5200	8.47
10	(K)SAVTALWGKVNVDVGVGEALGR(L)					20.08	1114.5920	2228.1670	4.68
11	(K)VLGAFSDGLAHLNLK(G)					19.83	835.4518	1669.8908	5.21
12	(K)VNVDEVGVGEALGR(L)					14.53	657.8376	1314.6648	4.14
13	(K)VVAGVANALAHK(Y)					13.12	575.3424	1149.6739	8.73
14	(K)VVAGVANALAHKYH(-)					13.97	725.4054	1449.7961	8.58
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка	
12	80	12	212.82	70.4	15314.3	8.90	P69905	Альфа-субъединица гемоглобина	

#	Аминокислотная последовательность	Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)AAWGKVGAGHAGEYGAEALER(M)	21.80	1022.0088	2043.0043	5.50
2	(K)FLASVSTVLTSK(Y)	18.75	626.8612	1252.7147	8.75
3	(K)LRVDPVNFK(L)	19.85	544.3186	1087.6259	8.75
4	(R)MFLSFPTTK(T)	20.15	536.2820	1071.5543	8.50
5	(K)TYFPHFDLSHGSAQVK(G)	22.83	917.4532	1833.8919	6.61
6	(K)TYFPHFDLSHGSAQVKGHGK(K)	24.27	1107.0497	2213.0887	8.25
7	(K)TYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK(V)	25.07	1171.0969	2341.1836	9.52
8	(K)VADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHANK(L)	25.13	749.8804	2996.4894	5.10
9	(K)VADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHANKLR(V)	25.98	817.1769	3265.6746	5.73
10	(R)VDPVNFK(L)	12.85	409.7252	818.4407	5.81
11	(K)VGAHAGEYGAEALER(M)	12.75	765.3733	1529.7343	4.75
12	(K)VGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTK(T)	26.52	1291.6424	2582.2708	5.50

Таблица 8

Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа триптических гидролизатов белковых фракций пациента №2

Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка			
1	75	29	403.46	64,9	41373.7	5.3	P68133	α-скелетный актин			
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида	
1	(K)AGFAGDDAPRAVFPSIVGRPR(H)						17.82	1078.5726	2156.1359	9.56	
2	(R)AVFPSIVGRPR(H)						15.90	599.8582	1198.7055	12.00	
3	(R)CPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMK(C)						22.22	1594.7415	3188.4737	4.75	
4	(R)DIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLEK(S)						24.33	788.1348	3149.5017	4.36	
5	(R)DLTDYLMK(I)						18.03	499.7473	998.4863	4.21	
6	(K)DLYANNVMSGGTTMYPGIADR(M)						18.17	1123.5162	2246.0216	4.21	
7	(K)EITALAPSTMK(I)						14.43	581.3138	1161.6184	6.10	
8	(K)EITALAPSTMKIK(I)						15.67	701.9041	1402.7974	8.69	

9	(K)EKLCYVALDFENEMATAASSSSLEK(S)						22.12	1397.1530	2793.2957	4.25
10	(R)FRCPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMK(C)						22.45	873.6692	3491.6432	5.50
11	(R)GILTLK(Y)						15.03	322.7215	644.4341	8.75
12	(R)GYSFVTTAER(E)						14.28	565.7785	1130.5477	6.00
13	(R)HQGVMVGMGQK(D)						11.00	586.2904	1171.5711	8.76
14	(R)HQGVMVGMGQKDSYVGDEAQS(K)						12.98	1176.0430	2351.0755	5.38
15	(R)HQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSK(R)						12.52	627.5525	2507.1766	6.75
16	(K)IIAPPER(K)						10.87	398.2418	795.4723	6.00
17	(K)IIAPPERK(Y)						9.45	462.2888	923.5673	8.75
18	(K)IKIIAPPER(K)						13.25	518.8308	1036.6513	8.75
19	(K)IKIIAPPERK(Y)						11.95	582.8785	1164.7463	9.99
20	(K)IWHHTFYNELR(V)						15.32	758.3801	1515.7492	6.92
21	(R)KDLYANNVMSGGTTMYPGIADR(M)						17.02	1187.5633	2374.1166	5.96
22	(K)LCYVALDFENEMATAASSSSLEK(S)						22.07	1268.5853	2536.1582	4.00
23	(R)LDLAGR(D)						10.63	322.6919	644.3726	5.84
24	(R)LDLAGRDLTDYLMK(I)						20.03	812.4263	1623.8411	4.43
25	(R)MQKEITALAPSTM(K)						14.55	774.9121	1548.8124	8.35
26	(R)MQKEITALAPSTM(K)K(I)						15.43	895.5012	1789.9914	9.70
27	(K)RGILTLK(Y)						13.70	400.7723	800.5352	11.00
28	(K)SYELPDGQVITIGNER(F)						18.60	895.9511	1790.8919	4.14
29	(K)SYELPDGQVITIGNERFR(C)						18.97	1047.5355	2094.0614	4.68
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
2	35	14	206.43	89.9	19128.3	4.91	Q96A32	Легкая цепь миозина 2		
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(R)DTFAAMGR(L)						12.65	434.7046	868.3982	5.84
2	(K)EAFTVIDQNRDGIIDKEDLR(D)						16.65	587.5556	2347.1888	4.23
3	(K)EASGPINFTVFLTMFGEK(L)						27.62	994.4984	1987.9834	4.53
4	(K)EASGPINFTVFLTMFGEK(L)K(G)						27.85	1115.0884	2229.1624	6.24
5	(K)FLEELLTTQCDR(F)						18.58	762.8730	1524.7363	4.14
6	(K)GADPEDVITGAFK(V)						18.48	660.3287	1319.6478	4.03

7	(K)LKGADPEDVITGAFK(V)						18.32	780.9188	1560.8268	4.56
8	(R)LNVKNEELDAMMK(E)						15.83	767.8854	1534.7604	4.68
9	(K)NICYVITHGDAK(D)						14.15	695.8428	1390.6784	6.74
10	(K)NICYVITHGDAKDQ(-)						14.22	881.9090	1762.8065	4.81
11	(K)NMWAAFPPDVGGNVDYK(N)						19.97	940.9392	1880.8636	4.21
12	(R)TVEGGSSSVFSMFDQTQIQEFK(E)						22.07	1226.5718	2452.1337	4.14
13	(K)VLDPEGKGTIK(K)						10.73	578.8351	1156.6572	6.04
14	(K)VLDPEGKGTIKK(K)						9.48	642.8806	1284.7522	8.47
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
4	44	15	283.63	91.1	16112.2	6.75	P68871	Бета-субъединица гемоглобина		
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)EFTPPVQAAYQK(V)						14.42	689.8566	1378.7001	6.10
2	(R)FFESFGDLSTPDAVMGNPK(V)						20.42	1029.9815	2058.9477	4.03
3	(R)FFESFGDLSTPDAVMGNPKVK(A)						19.92	1143.5623	2286.1111	4.56
4	(K)GTFATLSELHCDKLHVDPENFR(L)						17.97	1293.6254	2586.2405	5.31
5	(K)KVLGAFSDGLAHLNLDNLK(G)						18.90	899.4993	1797.9858	6.75
6	(R)LLGNVLVCVLAHHFGK(E)						23.55	889.0035	1776.9942	8.76
7	(R)LLGNVLVCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQK(V)						24.23	1046.2340	3136.6765	8.51
8	(R)LLVVYPWTQR(F)						20.02	637.8685	1274.7256	8.75
9	(R)LLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPK(V)						26.72	1105.5611	3314.6554	4.56
10	(K)SAVTALWGK(V)						16.68	466.7648	932.5200	8.47
11	(K)SAVTALWGKVNVDVGGGEALGR(L)						20.20	1114.5917	2228.1670	4.68
12	(K)VLGAFSDGLAHLNLDNLK(G)						19.77	835.4527	1669.8908	5.21
13	(K)VNVDEVGGGEALGR(L)						14.45	657.8383	1314.6648	4.14
14	(K)VVAGVANALAHK(Y)						13.05	575.3425	1149.6739	8.73
15	(K)VVAGVANALAHKYH(-)						13.85	725.4067	1449.7961	8.58
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
5	59	15	317.86	89.7	16112.2	6.75	P68871	Бета-субъединица гемоглобина		

#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)EFTPPVQAAYQK(V)						14.35	689.8569	1378.7001	6.10
2	(R)FFESFGDLSTPDVVMGNPK(V)						20.40	1029.9815	2058.9477	4.03
3	(K)GTFATLSELHCDK(L)						15.45	739.8529	1478.6944	5.32
4	(K)GTFATLSELHCDKLHVDPENFR(L)						22.62	1293.6257	2586.2405	5.31
5	(K)KVLGAFSDGLAHLNLIK(G)						22.12	899.4992	1797.9858	6.75
6	(K)LHVDPENFR(L)						13.78	563.7852	1126.5640	5.32
7	(R)LLGNVLCVLAHHFGK(E)						25.55	889.0042	1776.9942	8.76
8	(R)LLGNVLCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQK(V)						26.87	784.9285	3136.6765	8.51
9	(R)LLVVPWTQR(F)						19.92	637.8696	1274.7256	8.75
10	(K)SAVTALWGK(V)						16.62	466.7657	932.5200	8.47
11	(K)SAVTALWGKVVNDEVGGEALGR(L)						20.97	1114.5910	2228.1670	4.68
12	(K)VLGAFSDGLAHLNLIK(G)						19.60	835.4532	1669.8908	5.21
13	(K)VVNDEVGGEALGR(L)						14.40	657.8391	1314.6648	4.14
14	(K)VVAGVANALAHK(Y)						13.05	575.3442	1149.6739	8.73
15	(K)VVAGVANALAHKYH(-)						13.55	725.4051	1449.7961	8.58
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывание%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
5	38	8	141.91	48.2	16169.3	8.03	P02042	Дельта-субъединица гемоглобина		
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)KVLGAFSDGLAHLNLIK(G)						22.12	899.4992	1797.9858	6.75
2	(K)LHVDPENFR(L)						13.78	563.7852	1126.5640	5.32
3	(R)LLGNVLCVLAH(L)						22.92	663.9013	1326.7926	9.75
4	(R)LLVVPWTQR(F)						19.92	637.8696	1274.7256	8.75
5	(K)TAVNALWGK(V)						15.57	480.2691	959.5309	8.41
6	(K)VLGAFSDGLAHLNLIK(G)						19.60	835.4532	1669.8908	5.21
7	(K)VVAGVANALAHK(Y)						13.05	575.3442	1149.6739	8.73
8	(K)VVAGVANALAHKYH(-)						13.55	725.4051	1449.7961	8.58
Номер	Спектр	Кол-во	MS/MS	Покрывание%	MW	pI белка	ID белка	Название белка		

белка на геле		идентифицированных пептидов	Search Score		белка (Да)					
5	11	4	63.60	31.6	15314.3	8.90	P69905	Альфа-субъединица гемоглобина		
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)AAWGKVGAHAGEYGAEALER(M)						15.28	1022.0078	2043.0043	5.50
2	(K)LRVDPVNFK(L)						14.77	544.3192	1087.6259	8.75
3	(K)TYFPHFDLSHGSAQVK(G)						17.22	917.4516	1833.8919	6.61
4	(K)VGAHAGEYGAEALER(M)						12.65	765.3724	1529.7343	4.75
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрытие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
6	100	16	355.72	91.1	16112.2	6.75	P68871	Бета-субъединица гемоглобина		
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)EFTPPVQAAYQK(V)						14.33	689.8546	1378.7001	6.10
2	(R)FFESFGDLSTPDAVMGNPK(V)						20.35	1029.9818	2058.9477	4.03
3	(R)FFESFGDLSTPDAVMGNPKVK(A)						19.97	1143.5608	2286.1111	4.56
4	(K)GTFATLSELHCDK(L)						15.50	739.8520	1478.6944	5.32
5	(K)GTFATLSELHCDKLHVDPENFR(L)						22.88	1293.6255	2586.2405	5.31
6	(K)KVLGAFSDGLAHLNLIK(G)						18.80	899.4987	1797.9858	6.75
7	(R)LLGNVLVCVLAHHFGK(E)						26.00	889.0043	1776.9942	8.76
8	(R)LLGNVLVCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQK(V)						27.67	784.9284	3136.6765	8.51
9	(R)LLVVYPWTQR(F)						19.83	637.8693	1274.7256	8.75
10	(R)LLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPKVK(A)						28.22	886.2130	3541.8188	6.12
11	(K)SAVTALWGK(V)						16.68	466.7646	932.5200	8.47
12	(K)SAVTALWGKVNVDDEVGGEALGR(L)						20.42	1114.5932	2228.1670	4.68
13	(K)VLGAFSDGLAHLNLIK(G)						19.75	835.4507	1669.8908	5.21
14	(K)VNVDEVGGEALGR(L)						14.45	657.8379	1314.6648	4.14
15	(K)VVAGVANALAHK(Y)						13.05	575.3419	1149.6739	8.73
16	(K)VVAGVANALAHKYH(-)						13.47	725.4052	1449.7961	8.58
Номер	Спектр	Кол-во	MS/MS	Покрытие%	MW	pI белка	ID белка	Название белка		

белка на геле		идентифицированных пептидов	Search Score		белка (Да)					
6	40	6	132.38	36	16169.3	8.03	P02042	Дельта-субъединица гемоглобина		
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)KVLGAFSDGLAHLNLIK(G)						18.80	899.4987	1797.9858	6.75
2	(R)LLGNVLVCVLAR(N)						22.90	663.9007	1326.7926	9.75
3	(R)LLVVYPWTQR(F)						19.83	637.8693	1274.7256	8.75
4	(K)VLGAFSDGLAHLNLIK(G)						19.75	835.4507	1669.8908	5.21
5	(K)VVAGVANALAHK(Y)						13.05	575.3419	1149.6739	8.73
6	(K)VVAGVANALAHKYH(-)						13.47	725.4052	1449.7961	8.58
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
7	45	14	157.50	61	17240.5	7.14	P02144	Миоглобин		
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)ALELFR(K)						17.22	374.7224	748.4352	6.05
2	(K)ALELFRK(D)						15.03	438.7694	876.5302	8.79
3	(K)ALELFRKDMASNYK(E)						16.13	562.6302	1685.8680	8.54
4	(K)DMASNYKELGFQG(-)						16.85	730.3312	1459.6522	4.37
5	(K)FDKFK(H)						8.80	342.6893	684.3715	8.59
6	(K)GHHEAEIKPLAQSHATK(H)						9.70	464.2473	1853.9617	7.03
7	(K)GHPETLEKFDKFK(H)						13.68	788.4143	1575.8166	6.76
8	(K)HGATVLTALGGILK(K)						21.25	675.9107	1350.8104	8.76
9	(K)HGATVLTALGGILKK(K)						19.80	739.9584	1478.9053	10.00
10	(K)HGATVLTALGGILKKK(G)						18.85	804.0057	1607.0003	10.30
11	(K)HLKSEDEMK(A)						3.78	558.7723	1116.5354	5.44
12	(K)HPGDFGADAQGAMNK(A)						11.98	758.3387	1515.6645	5.21
13	(K)KHGATVLTALGGILK(K)						19.80	739.9584	1478.9053	10.00
14	(R)LFKGHPETLEK(F)						11.13	649.8605	1298.7103	6.76
Номер	Спектр	Кол-во	MS/MS	Покрывтие%	MW	pI белка	ID белка	Название белка		

белка на геле		идентифицированных пептидов	Search Score		белка (Да)					
9	76	12	198.74	74.1	16169.3	8.03	P68871	Бета-субъединица гемоглобина		
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)EFTPQMQAAYQK(V)						13.77	721.3440	1441.6780	6.10
2	(R)FFESFGDLSSPDVVMGNPK(V)						20.43	1022.9780	2044.9321	4.03
3	(R)LLGNVLVCVLAR(N)						23.30	663.9010	1326.7926	9.75
4	(R)LLVVYPWTQR(F)						20.23	637.8688	1274.7256	8.75
5	(R)LLVVYPWTQRFFESFGDLSSPDVVMGNPK(V)						27.13	1100.8880	3300.6398	4.56
6	(R)NFGKEFTPQMQAAYQK(V)						15.85	944.4582	1887.9058	8.50
7	(K)TAVNALWGK(V)						15.62	480.2708	959.5309	8.41
8	(K)TAVNALWGKVNVDVVGGEALGR(L)						20.68	1099.0928	2197.1724	5.74
9	(K)VLGAFSDGLAHLNLIK(G)						21.22	835.4497	1669.8908	5.21
10	(K)VNVDAVGGEALGR(L)						14.32	628.8350	1256.6593	4.37
11	(K)VVAGVANALAHK(Y)						13.27	575.3432	1149.6739	8.73
12	(K)VVAGVANALAHKYH(-)						14.48	725.4031	1449.7961	8.58
Номер белка на геле	Спектр	Кол-во идентифицированных пептидов	MS/MS Search Score	Покрывтие%	MW белка (Да)	pI белка	ID белка	Название белка		
10	56	12	195.87	70.4	15314.3	8.90	P69905	Альфа-субъединица гемоглобина		
#	Аминокислотная последовательность						Время удерживания (мин)	m/z (Да)	MH ⁺ (Да)	pI пептида
1	(K)AAWGKVGAGHAGEYGAEALER(M)						23.35	1022.0083	2043.0043	5.50
2	(K)FLASVSTVLTSK(Y)						20.58	626.8609	1252.7147	8.75
3	(K)LRVDPVNFK(L)						22.13	544.3178	1087.6259	8.75
4	(R)MFLSFPTTK(T)						22.17	536.2831	1071.5543	8.50
5	(K)TYFPHFDLSHGSAQVK(G)						24.33	917.4530	1833.8919	6.61
6	(K)TYFPHFDLSHGSAQVKGHGK(K)						25.72	1107.0498	2213.0887	8.25
7	(K)TYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK(V)						26.72	586.0547	2341.1836	9.52
8	(K)VADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK(L)						26.22	749.8818	2996.4894	5.10
9	(K)VADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLR(V)						27.32	817.1776	3265.6746	5.73

10	(R)VDPVNFK(L)	12.85	409.7247	818.4407	5.81
11	(K)VGAHAGEYGAEALER(M)	12.68	765.3733	1529.7343	4.75
12	(K)VGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTK(T)	27.75	646.3271	2582.2708	5.50